"十一五"国家重点图书出版规划项目



生命科学实验指南系列

Epidermal Cells

Methods and Protocols

表皮细胞

实验指南

〔加拿大〕K. 图尔克森 主编

彭代智 主译

黄文华 赵雄飞 主审



科学出版社

www.sciencep.com

(Q-2538.0101)



生命科学实验指南系列（“十一五”国家重点图书出版规划项目）

- 生物实验室管理手册
- 分子生物学实验室工作手册
- 上皮细胞培养指南
- 现代生物化学与分子生物学仪器与设备
- 干细胞实验指南
- 现代分子生物学实验原理与技术
- R语言及Bioconductor在基因组分析中的应用
- 现代神经科学研究技术
- 精编分子生物学实验指南（第五版）
- 精编细胞生物学实验指南
- 精编蛋白质科学实验指南
- 分子细胞遗传学——技术与应用
- DNA微阵列实验指南
- 生理学实验指南
- 动物细胞培养——基本技术指南（第五版）
- 植物生物学与生态学实验
- 实验细胞资源的描述标准与管理规范
- 实验动物设施运行管理指南
- 生命科学实验设计指南
- 基因转移——DNA和RNA的转运与表达
- 精编免疫学实验指南
- 精编人类遗传学实验指南
- 现代细胞生物学技术
- 现代工业微生物学实验技术
- 人干细胞培养
- 单分子技术实验指南
- 遗传变异分析实验指南
- 免疫学技术及其应用
- 表皮细胞实验指南



生物分社
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:lifescience@mail.sciencep.com
销售分类建议：生物科学/细胞生物学



ISBN 978-7-03-028236-1
定 价：90.00 元

生命科学实验指南系列

表皮细胞实验指南

Epidermal Cells: Methods and Protocols

〔加拿大〕K. 图尔克森　主编
彭代智　主译
黄文华　赵雄飞　主审

科学出版社
北京

图字：01-2008-0358 号

内 容 简 介

本书是一本有关表皮细胞和表皮干细胞研究的最新且实用的实验技术指南。全书共42章，涵盖了人和小鼠表皮细胞分离培养的技术方法以及表皮干细胞富集、鉴定、培养和体内标记的技术方法，详细介绍了免疫学、细胞生物学、分子生物学和基因组学等最新技术在研究表皮组织的胚胎发生、发育、分化及皮肤疾病中的应用，还叙述了表皮细胞和成纤维细胞的基因修饰（转染、突变和打靶）、组织工程皮肤的体外构建和体内移植及毛囊的基因和干细胞治疗等具有广泛开发和应用前景的重要技术，对从事上皮细胞尤其是表皮细胞和表皮干细胞的教学、科研和开发人员来说是一本很有价值的工具书。

本书可作为上皮细胞尤其是表皮细胞和表皮干细胞研究、开发和应用的工具书，也可供细胞生物学、分子生物学、发育生物学、临床医学等有关领域的教学、科研人员参考。

Translation from the English language edition:
Epidermal Cells: Methods and Protocols by Kursad Turksen

图书在版编目（CIP）数据

表皮细胞实验指南/（加拿大）图尔克森（Turksen, K.）主编，彭代智主译.
—北京：科学出版社，2010
（生命科学实验指南系列）
ISBN 978-7-03-028236-1

Ⅰ. ①表… Ⅱ. ①图… ②彭… Ⅲ. ①表皮-细胞生物学-实验-指南
Ⅳ. ①Q2-33②R322. 99-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2010）第 128778 号

责任编辑：莫结胜　刘　晶 / 责任校对：李奕萱
责任印制：钱玉芬 / 封面设计：耕者设计工作室

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com
铭浩彩色印装有限公司 印刷
科学出版社发行　各地新华书店经销
*
2010年7月第 一 版　开本：787×1092　1/16
2010年7月第一次印刷　印张：29 1/2　插页：2
印数：1—2 500　字数：673 000

定价：90.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

主　译　彭代智
主　审　黄文华　赵雄飞

译者所在单位及译者名单（按姓氏汉语拼音排序）

第三军医大学	陈　建	陈　杰	陈　林	党永明	顾长国
	黄　炜	黄文华	黄跃生	蒋丽莉	金　旻
	李　磊	林　恒	刘泽军	罗海水	罗向东
	彭代智	粟永萍	苏踊跃	孙慧勤	王　刚
	王丽华	王亚洲	王　勇	伍津津	严　泉
	张教扬	赵雄飞	赵　云	郑必祥	朱崇涛
	邹仲敏				
第四军医大学	高天文	胡大海	刘佳琦	吕雅洁	
解放军总医院	付小兵	韩　冰			
中山大学	刘旭盛	唐锦明			
清华大学	李　响	孟安明	齐晶晶		
上海交通大学	曹谊林	胡葵葵	陆树良	牛轶雯	周广东

编　者

BRIAN J. ANESKIEVICH • *Departments of Nutritional and Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Connecticut, Storrs, CT*
CLAUDE BACKENDORF • *Laboratory of Molecular Genetics, Leiden Institute of Chemistry, Leiden, The Netherlands*
WILLIS BACON • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH*
JACKIE R. BICKENBACH • *Department of Anatomy and Cell Biology, University of Iowa, Iowa City, IA*
CAROLYN BYRNE • *Barts and The London Queen Mary School of Medicine and Dentistry, University of London, London, UK*
ALBERTO CALLIGARO • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
ANDREA CASASCO • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
MARCO CASASCO • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
PIERRE CHAMBON • *Institut Clinique de la Souris (ICS) and IGBMC, Illkirch, France*
WING Y. CHANG • *Department of Physiology and Pharmacology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada*
ROBERT MAN-KIT CHEUNG • *Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*
ROBERT M. CLEGG • *Laboratory for Fluorescence Dynamics, Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL*
ANTONIA ICARO CORNAGLIA • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
KRISTINE CUFFLEY • *Laboratoire de Recherche des Grands Brûles/LOEX and Department of Surgery, Laval University, Québec, Québec, Canada*
LINA DAGNINO • *Departments of Physiology and Pharmacology and of Pediatrics, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada*
RICHARD L. DAVIS, JR. • *NCR Division, Midwest Research Institute, Rockland, MD*
GYS DE JONGH • *Department of Dermatology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*
BILGE DIKER • *Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*
THOMAS P. DOOLEY • *IntegriDerm Inc., Birmingham, AL*
RUSLA M. DUBREUIL • *Open Biosystems Inc., Huntsville, AL*
DAVID F. FISCHER • *Netherlands Institute for Brain Research, Amsterdam, The Netherlands*
PHILIP FLECKMAN • *Department of Medicine (Dermatology), University of Washington, Seattle, WA*
ANTHONY M. FLORES • *Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Connecticut, Storrs, CT*

NORBERT E. FUSENIG • *Division of Carcinogenesis and Differentiation, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*
JONATHAN A. GARLICK • *Division of Cancer Biology and Tissue Engineering, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dental Medicine and Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, Tufts University, Boston, MA*
FUMITAKE GEJYO • *Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan*
LUCIE GERMAIN • *Laboratoire de Recherche des Grands Brûles/LOEX and Department of Surgery, Laval University, Québec, Québec, Canada*
MARC G. GOLIGHTLY • *Department of Pathology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY*
SHARI GREENBERG • *Division of Cancer Biology and Tissue Engineering, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dental Medicine and Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, Tufts University, Boston, MA*
BARBARA HAGER • *Department of Medicine (Dermatology), University of Washington, Seattle, WA*
KERRY M. HANSON • *Department of Chemistry, University of California, Riverside, CA*
MATTHEW J. HARDMAN • *School of Biological Sciences, University of Manchester, Manchester, UK*
NAKA HATTORI • *Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/Veterinary Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan*
CINDY HAYWARD • *Laboratoire de Recherche des Grands Brûles/LOEX and Department of Surgery, Laval University, Québec, Québec, Canada*
ROBERT M. HOFFMAN • *AntiCancer Inc., San Diego, CA*
ALAIN HOVNANIAN • *INSERM CPTP-U563, Service de Génétique Médicale, CHU Purpan, Toulouse, France*
OTMAR HUBER • *Charité-Medical Universities Berlin, Campus Benjamin Franklin, Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Berlin, Germany.*
NAM-HO HUH • *Department of Cell Biology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama, Japan*
OLGA IGOUCHEVA • *Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Jefferson Institute of Molecular Medicine, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA*
WALLACE IP • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH*
AKEMI ISHIDA-YAMAMOTO • *Department of Dermatology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan*
MAYUMI ITO • *Basic Research Laboratory, Kanebo Ltd., Odawara, Japan*
BASTIAAN J. H. JANSEN • *Department of Tumor Immunology, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, Nijmegen, The Netherlands*
KIM BAK JENSEN • *Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Aarhus, Denmark*

GYS DE JONGH • *Department of Dermatology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*
MONIKA JOST • *SymbioTec GmbH, Saarbrücken, Germany*
TAKASHI KAMEDA • *Department of Biochemistry, Akita University, School of Medicine, Akita, Japan*
MARIKO KASHIWAGI • *Institute of Molecular Oncology, Showa University, Tokyo, Japan*
PRITINDER KAUR • *Epithelial Stem Cell Biology Laboratory, Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Victoria, Australia*
DAVID KIMELMAN • *Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle*
KENJI KIZAWA • *Basic Research Laboratory, Kanebo Ltd, Odawara, Japan*
TAKASHI KOBAYASHI • *Department of Dermatology, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan*
LÁSZLÓ G. KÖMÜVES • *Department of Dermatology, VA Medical Center, University of California at San Francisco, San Francisco, CA and Millennium Pharmaceuticals, San Francisco, CA*
PETER KRISTENSEN • *Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Aarhus, Denmark*
COREY LARGMAN • *Departments of Dermatology and Medicine, VA Medical Center, University of California at San Francisco, San Francisco, CA*
DANIELLE LAROUCHE • *Laboratoire de Recherche des Grands Brûles/LOEX and Department of Surgery, Laval University, Québec, Québec, Canada*
AMY LI • *Epithelial Stem Cell Biology Laboratory, Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Victoria, Australia*
MEI LI • *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) and ICS, Illkirch, France*
NICOLE MAAS-SZABOWSKI • *Division of Carcinogenesis and Differentiation, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*
ALEXANDER MARGULIS • *Division of Cancer Biology and Tissue Engineering, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dental Medicine and Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, Tufts University, Boston, MA*
HIROKI MARUYAMA • *Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan*
MAJA MATIC • *Departments of Biochemistry and Cell Biology and Pathology, The State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY*
JIN-JUN MENG • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, Universit of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati OH*
DANIEL METZGER • *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) and ICS, Illkirch, France*
JUN-ICHI MIYAZAKI • *Division of Stem Cell Regulation Research, Osaka University Medical School, Osaka, Japan*
HITOSHI MIZUTANI • *Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Mie University, Mie, Japan*
REBECCA J. MORRIS • *Department of Dermatology, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY*

JUN OHGANE • *Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/ Veterinary Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan*
WILLIAM R. OTTO • *Histopathology Unit, London Research Institute, Cancer Research UK, London, UK*
ANNALISA PIRRONE • *Department of Medicine (Dermatology), University of Washington, Seattle, WA*
RICHARD B. PRESLAND • *Departments of Oral Biology and Medicine (Dermatology), University of Washington, Seattle, WA*
CHRISTOPHER PULLIS • *Department of Pathology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY*
RAMTIN RAHBAR • *Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*
SHANKER P. REDDY • *IntegriDerm Inc., Birmingham, AL*
RICHARD P. REDVERS • *Epithelial Stem Cell Biology Laboratory, Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Victoria, Australia*
FEDERICA RIVA • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
ULRICH RODECK • *Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Sidney Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA*
MEGHAN ROJAS • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati OH*
JOOST SCHALKWIJK • *Department of Dermatology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*
CHUN-SHEN SHEN • *Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Mie University, Japan*
KUNIO SHIOTA • *Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/Veterinary Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan*
SANFORD R. SIMON • *Departments of Biochemistry and Cell Biology and Pathology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY*
HANS-JÜRGEN STARK • *Division of Carcinogenesis and Differentiation, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*
JOHN T. STICKNEY • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati OH*
TOSHIHIRO SUGIYAMA • *Department of Biochemistry, Akita University, School of Medicine, Akita, Japan*
TAMMY-CLAIRE TROY • *Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*
KURSAD TURKSEN • *Hormones, Growth, and Development Program, Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*
PIET E. J. VAN ERP • *Department of Dermatology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlends*
FRED VAN RUISSEN • *Department of Neurogenetics, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands*
ASHLEY E. WEBB • *Molecular and Cellular Biology Program, Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle*
JÖRG WEISKE • *Charité-Medical Universities Berlin, Campus Benjamin Franklin, Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Berlin, Germany.*

SARAH H. WILLIAMS • *Pediatric Molecular Genetics, Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Oxford, UK*
WEI-YANG WU • *Department of Dermatology, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY*
KIYOFUMI YAMANISHI • *Department of Dermatology, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan*
KYONGGEUN YOON • *Departments of Dermatology and Cutaneous Biology and Biochemistry and Molecular Pharmacology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA*
WEITIAN ZHANG • *Division of Cancer Biology and Tissue Engineering, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dental Medicine and Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, Tufts University, Boston, MA*

中译本序

皮肤是人体最大的器官，具有保护体内组织、调节体温、感受刺激、排泄废物和参与免疫应答等重要的生物学功能。长久以来，表皮细胞一直被认为是难以培养的细胞，限制了皮肤生物学基础研究的发展。皮肤覆盖在人体表面，易于受到伤害，如发生大面积烧伤、皮肤溃疡和皮肤撕脱伤等。自体皮肤移植、异体皮肤移植或其他皮肤代用品是临床修复各种皮肤缺损的主要途径，但常存在自体皮源不足、免疫排斥和修复效果差等难题。组织工程皮肤为解决这些难题带来了新的希望。Rheinwald 和 Green 于 1975 年建立了表皮细胞培养技术，Jones 于 1997 年从表皮基底层中分离出了表皮干细胞，为皮肤生物学的基础研究和组织工程皮肤的临床应用奠定了重要的技术和理论基础。

《表皮细胞实验指南》（Kursad Turksen 主编的 *Epidermal Cells：Methods and Protocols*，Humana Press，Totowa，New Jersey，2005）涵盖表皮细胞和表皮干细胞一系列先进而实用的实验方案。此书不仅介绍了表皮细胞和表皮干细胞分离、培养和鉴定的基本实验技术，而且对表皮组织胚胎发生、发育、分化以及皮肤疾病研究中所用的免疫学、细胞生物学、分子生物学新技术进行了详尽阐述。皮肤种子细胞基因修饰、组织工程皮肤体外构建和体内移植，以及毛囊基因和干细胞治疗等前沿技术的介绍还为读者展示出极其诱人的应用前景。这本书的特点在于既有基础研究，又有应用研究；既有详细的实验步骤，又指出了可能遇到的难点及其解决办法，还有十分详尽的参考文献。因此，这本书是一本十分有用的工具书，从事表皮细胞和表皮干细胞的教学、科研和开发的人员将会从中大获裨益。

第三军医大学的科技人员作为主体，联合多个院校从事相关领域研究的专家学者，在完成繁重的教学、科研和医疗任务之余，抽出时间将这本书译成中文，相信这本书的翻译出版会对我国皮肤生物学的基础研究、皮肤疾病和损伤的临床应用研究起到重要的促进作用。

中国工程院院士
防原医学与病理学教授　程天民

2010 年 7 月 1 日

译者的话

1975年Rheinwald和Green在*Cell*杂志发表成功培养表皮细胞的论文以来，表皮细胞的分离和培养技术已经取得重大进展。干细胞是近年来生物医学领域的研究热点之一，表皮干细胞和毛囊干细胞也分别由Jones和Talor于1997年和2000年成功分离培养。随着免疫学、细胞生物学、分子生物学和基因组学等学科的不断发展，来自这些领域的前沿技术已广泛应用于表皮细胞、表皮干细胞及表皮组织的研究。《表皮细胞实验指南》一书反映了该领域成熟的一系列操作规程，内容丰富而新颖，给科研人员提供了先进和系统的技术方法，可作为一本经典的上皮细胞尤其是表皮细胞研究用工具书。

这本书的翻译和审校是在第三军医大学复合伤研究所程天民院士的鼓励下，由第三军医大学、第四军医大学、解放军总医院、清华大学、上海交通大学和中山大学的第一线科技骨干完成的，他们从繁重的医教研工作中抽出时间，加班加点，为尽快完成这本书的翻译审校工作作出了很大的贡献。付小兵院士、孟安民院士和曹谊林教授亲自参与相关章节的译校工作，是对这本书的极大支持。科学出版社科学出版中心的马学海副主任和莫结胜编辑为确保高质量地完成这本书的翻译、定稿和出版工作付出了大量精力。在此，我谨向所有参加翻译、校对、编辑和出版的同志们表示由衷的敬佩和感谢。

最后，我要特别感谢我的老师程天民院士亲自为这本书作序，黄文华教授和赵雄飞教授为这本书逐字逐句审校，他们的关怀、指导与帮助给了我无尽的信心和勇气。此外，这本书的出版还得到国家高技术研究发展计划项目（“863”计划）（2006AA02A121）、国家重点基础研究发展计划项目（“973”计划）（2005CB522605）、国家重点实验室自主研究I类课题（SKLZZ200904）的大力支持，在此深表谢意。由于这本书的专业面广、翻译量大、时间紧，加之译者的知识、能力、精力和水平有限，因此书中难免存在错漏和不当之处，敬请专家和读者批评指正。

彭代智

2010年6月16日于重庆

前　言

自从二十多年前 Howard Green 和同事们第一次成功地在体外培养了表皮细胞并使其持续生长，我们对这种细胞的了解和操作能力得到惊人的提高。然而，多年来在某些范围内一直有一种近乎神秘的观念，那就是表皮细胞的研究工作较难开展。尽管和成纤维细胞相比，这种观念通常是正确的，但该领域还是在建立这种细胞类型的许多方法学方面取得了特别的进展。因此，我感到现在正是收集一些有用的实验方案的时候，这些实验方案涵盖了培养表皮细胞、富集很早期表皮祖细胞以及研究表皮细胞在体内和体外定向分化的不同方法和模型。《表皮细胞实验指南》一书并不意味着广泛收集所有操作表皮细胞的实验方案，而是面向有经验的和初学的表皮生物学研究者收集他们很容易在自己实验室重复的又十分有价值的实验方案。我能完成这本书，与那些非常忠诚的撰稿者是分不开的，他们乐意无私分享他们“来之不易”的方法。我感谢他们所有的人。

我也想借此机会来感谢我多年来的好导师 Jane Aubin 博士，特别是他在我作为细胞培养和分化的初学者时灌输给我的极大的热情和严谨。我同样感谢 Elaine Fuchs 博士给了我自己动手操作表皮细胞和小鼠模型进行研究的机会。没有他们的支持和给我的机会，我不可能在令人兴奋的科学研究领域得以成长。

John Walker 博士在我所选择的科研项目上对我一直的支持和帮助也非常重要。此外，我感谢所有在 Humana Press 给过我热心支持的人，特别是 Craig Adams。

我非常感谢 N. Urfe 与我进行的启发性讨论。

最后，我感谢我伟大的合作者——Tammy Troy，她无尽的爽朗和热情的帮助与支持使我很愉快地完成了这本书。

库尔萨德·图尔克森（Kursad Turksen）

（彭代智　译）

目　录

第四部分 表皮功能分析的方法及途径

第五部分 移植与基因治疗

第一部分　角质形成细胞和器官培养

第 1 章　小鼠角质形成细胞的原代培养

Annalisa Pirrone，Barbara Hager，Philip Fleckman

摘　要：小鼠表皮角质形成细胞通常难以在体外生长。在这一章，我们介绍从新生小鼠单一个体分离出的表皮角质形成细胞用于长期培养的一种方法。我们描述的实验方案对于从转基因或基因敲除小鼠收集细胞进行分离和分析尤其有用；解释了怎样利用添加成纤维细胞条件培养基和包被小鼠 IV 型胶原的培养皿来培养这些需要复杂营养成分的细胞并使其能够多次传代；叙述了怎样诱导培养细胞表达表皮分化后期阶段的标记，如果需要的话，可从小鼠取样现场运送全部小鼠皮肤用于培养。本章还介绍了一种用液氮长时间储存后仍能确保细胞高活力的深低温保存方法。目前从事表皮缺陷转基因小鼠或裸鼠生产的研究者应该关注本章详细描述的这些技术。
关键词：角质形成细胞；转基因；基因敲除；表皮分化；细胞培养；皮肤

1　导言

体外研究可以加强对表皮缺损转基因或基因敲除小鼠的分析。从转基因或基因敲除幼龄小鼠的单一个体分离出小鼠表皮角质形成细胞用于长期培养是这些研究的一个重要工具。为了成功地维持细胞生长和传代，小鼠角质形成细胞的培养需要添加成纤维细胞条件培养基、低钙环境及包被小鼠 IV 型胶原附着物的培养皿。在这一章中，我们描述了怎样制备小鼠角质形成细胞生长所必需的小鼠成纤维细胞条件培养基，以及怎样从新生小鼠个体的皮肤分离和培养细胞；介绍了用包被胶原的培养皿进行有效传代培养和诱导表皮分化晚期标记表达的技巧；提出了一种从小鼠取皮现场转运小鼠皮肤用于培养的方法和一个保持培养角质形成细胞储存物活性的低温保存方案。通过制作小鼠模型来寻求增加表皮分化研究手段的生物学家应该对本章所概括的各种操作方法有极大的兴趣。

2　材料

2.1　螯合处理的胎牛血清（cFBS）

（1）Chelex 100 树脂［钠，200～400 目（干燥），75～150 μm 颗粒（湿润）；Bio-Rad，Hercules，CA，cat. no. 142-2842］；每升 PBS 配制 200 g Chelex 100 树脂[1]。

（2）Whatman Grade No. 1 滤纸（Whatman，UK，cat. no. 1093-111）和布氏漏斗［备选，见注意事项（1）］。

（3）无内毒素的 Milli-Q 去离子水（18MΩ・cm 的电阻率，来自 Milli-Q Plus-UF 水系统或来自类似于 I 型水过滤系统的无内毒素水；Millipore，Bedford，MA）。当螯

合 1 L 的血清时，每次洗涤可用 1.30 L 的无内毒素 Milli-Q 去离子水（见 3.1.1）。

(4) Dulbecco 磷酸盐缓冲盐溶液（D-PBS）[2]：0.2 g KCl，0.2 g KH_2PO_4，8 g NaCl，2.16 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$；配制 1 L 的 1×D-PBS，可将所有的干燥化学试剂加入 600 ml 的无内毒素去离子水中；调节 pH 到 7.4，加水定容到 1 L；在层流通风橱中将溶液无菌过滤（0.22 μm）到无菌瓶中；保存在 4℃。当螯合的血清为 1 L 时，每次漂洗可用 1.30 L 的 D-PBS（见 3.1.1）。

(5) FBS：所有批次的血清都经过新生儿包皮角质形成细胞和大鼠表皮角质形成细胞系的最佳生长和分化检验（文中所用批号为“Premium”，未热灭活；Atlanta Biologicals，Norcross，GA；cat. no. S11150）。

(6) 500 ml 的瓶顶过滤器：直径 70 mm 的滤膜、初次过滤的滤膜孔径为 0.45 μm 和无菌过滤的滤膜孔径为 0.22 μm（Corning，Harrodsburg，KY，cat. no. 430512、no. 430521）。

2.2 原代成纤维细胞的条件培养基（CM1）

(1) 新生小鼠（0～2 d）[见注意事项（2）]。

(2) 1 mol/L $CaCl_2$溶液：于无内毒素 Milli-Q 去离子水中溶解 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$（FW 147.02）；0.22 μm 的无菌滤器过滤。

(3) 100 mm×15 mm 的细菌学培养皿（BD Falcon Optilux™或类似型号；Becton Dickinson，Franklin Lakes，NJ；cat. no. 351001）。

(4) Whatman Grade No. 1 滤纸 [见 2.1 第（2）条]：剪成适合 100 mm 的培养皿；用铝箔包在外面，使用前高压灭菌。

(5) 70%乙醇。

(6) D-PBS [见 2.1 第（4）条]。

(7) 加有 2%抗生素/抗真菌素（*V/V*）的 D-PBS（抗生素/抗真菌素包括 10 000 U/ml 青霉素 G 钠、10 000 μg/ml 硫酸链霉素和 25 μg/ml 两性霉素 B；Invitrogen/GIBCO，Carlsbad，CA；cat. no. 15140-022）。

(8) 高钙培养基（HCM）：100 ml 无氯化钙的 Eagle's 最低必需培养基（EMEM）（含 Earles 平衡盐溶液、非必需氨基酸和 L-谷氨酰胺；Cambrex Biosciences，Walkersville，MD；cat. no. 06-174G），8 ml FBS，1 ml 抗生素/抗真菌素；将 1 mol/L 的 $CaCl_2$ 溶液加入到培养基中使其 Ca^{2+} 浓度为 0.6 mmol/L [见注意事项（3）]。HCM 避光储藏在 4℃，可达 1 个月之久。

(9) 低钙培养基（EMEM.06）：100 ml 无氯化钙的 EMEM；8 ml cFBS；1 ml 的抗生素/抗真菌素；将 1 mol/L $CaCl_2$ 溶液加到培养基中使其 Ca^{2+} 浓度为 0.06 mmol/L [见注意事项（4）]。于 4℃避光储藏，可达 1 个月之久。

(10) 胶原酶溶液：0.175 g 胶原酶（粗制，I 型，用于组织培养；Invitrogen/GIBCO；cat. no. 17100-017）；50 ml 199 培养基（Invitrogen/GIBCO，cat. no. 12340030）。需要时新鲜配制，用前应预热到 37℃。

(11) 0.25%胰蛋白酶（Invitrogen/GIBCO，cat. no. 15050-057）：需要使用的当天，可解冻一个新鲜的分装量并保存在 4℃。

2.3 用小鼠 IV 型胶原包被培养皿

(1) 0.05 mol/L HCl：用 Milli-Q 去离子水稀释浓 HCl (11.6 mol/L) (1 L 溶液用 4.3 ml 浓 HCl)，再过滤除菌。

(2) 小鼠 IV 型胶原 (Collaborative Biomedical Products; cat. no. 354233)：用 0.05 mol/L HCl 稀释到所需要的浓度；1 μg 胶原/cm^2 培养皿用于角质形成细胞的传代，5 μg 胶原/cm^2 培养皿用于诱导分化和 (或) 蛋白质提取 [见注意事项 (5)]。

(3) 加有 1%抗生素/抗真菌素的 D-PBS [见 2.2 第 (7) 条描述的抗生素/抗真菌素]。

(4) 组织培养皿 (Corning, cat. no. 430165 或 430166)：35 mm 或 60 mm 组织培养用的培养皿 (聚苯乙烯，无菌)。

2.4 角质形成细胞的分离和传代

2.4.1 初代培养

(1) 新生小鼠 (0～2 d) [见注意事项 (2)]。

(2) 100 mm×15 mm 细菌学培养皿 [见 2.2 第 (3) 条]。

(3) Whatman Grade no. 1 过滤纸 [见 2.1 第 (2) 条]。

(4) 70%乙醇。

(5) 加有 1%抗生素/抗真菌素的 D-PBS [见 2.2 第 (7) 条描述的抗生素/抗真菌素]。

(6) EMEM.06 [见 2.2 第 (9) 条]。

(7) CM1 (见 2.2)。

(8) 湿化孵箱 37℃，设置 CO_2 浓度为 4.5% [见注意事项 (6)]。

(9) 以 1 μg 胶原/cm^2 或 5 μg 胶原/cm^2 包被，制成 IV 型胶原包被的培养皿 (见 2.3 和 3.3)。

(10) 聚苯乙烯血清学移液管 (Falcon; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; cat. no. 357543、357551 和 357525)。

(11) HEPES 缓冲盐水，pH 7.4 (HBS)[3]：7.14 g HEPES 粉剂 (30 mmol/L)，0.72 g 右旋糖 (D-葡萄糖，无水，4 mmol/L)，0.22 g KCl (3 mmol/L)，7.6 g NaCl (130 mmol/L)，0.142 g Na_2HPO_4 (1 mmol/L)；0.0012 g 酚磺酞；约 14 ml 1 mol/L NaOH。将所有干燥的化学试剂添加到 600 ml Milli-Q 去离子水中，混匀；加 14 ml 1 mol/L NaOH，混匀，再调节 pH 到 7.4；定容至 1 L；过滤除菌。

(12) 小鼠角质形成细胞生长培养基 (N-培养基)：使用 1∶1 的 CM1 和 EMEM.06 [见注意事项 (7)]；加入下列添加剂的 N-培养基可在 4℃放置 4～5 d。

(13) 0.25%胰蛋白酶 [见 2.2 第 (11) 条]。

2.4.2 添加剂

(1) 表皮生长因子 (EGF; BD Biosciences, cat. no. 354001)：把 EGF 溶解在含有

0.1%牛血清白蛋白（BSA）（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO；cat. no. 40001）和 HBS 的无菌溶液中，配制成 10 μg/ml EGF 的建议工作溶液，加 1μl/5 ml N-培养基（或每毫升 N-培养基含 2 ng EGF）；分装冷存在－20℃，可稳定 2 年，避免反复冻融。

（2）氨基胍硝酸盐（AG；MW 137.1；Sigma-Aldrich；cat. no. A5，610-8）：溶解在无内毒素去离子水中，无菌过滤；配制成 0.75 mol/L 的建议工作溶液，每毫升 N-培养基添加 1 μl 的工作液（在 N-培养基中的终浓度为 0.75 mmol/L）；保存在 4℃，37℃预热，涡旋混匀 10 s 后使用；每 6～8 周配制一批新鲜的试剂。

（3）霍乱毒素（CT；Vibrio cholerae，Type Inaba 569B；Calbiochem，San Diego，CA；cat. no. 227035）：溶解在 HBS 中；建议配制 10^{-6} mol/L 的储备液；由此储备液配制成 10^{-7} mol/L 的建议工作液，在每毫升 N-培养基中加入 1 μl 的工作液（在 N-培养基中的终浓度为 10^{-10} mol/L）；保存于 4℃的水溶液可达 6～8 个月。

（4）氢化可的松（HC；最低量 98%；Sigma-Aldrich；cat. no. H-4001）：在 HBS 中配制所建议的 0.04 mg/ml HC 工作液，即将 HC 溶解在无水乙醇中使其浓度达 10 mg HC/ml 乙醇，然后加 HBS 至浓度为 0.04 mg/ml；无菌过滤；每毫升 N-培养基加 10 μl 的工作液；工作液在 4℃条件下可保存一年。

2.4.3 传代培养

（1）0.25%胰蛋白酶［见 2.2 第（11）条］。

（2）D-PBS（见 2.1）。

（3）EMEM.06［见 2.2 第（9①）条］。

（4）N-培养基（见 2.4）。

（5）湿化的孵箱设为 37℃、4.5%CO_2。

（6）包被 IV 型胶原的培养皿：1 μg 胶原/cm^2 或 5 μg 胶原/cm^2（见 2.3 和 3.3）。

（7）聚苯乙烯血清学移液管［见 2.4 第（7）条］。

2.5 运送和接收小鼠皮肤

2.5.1 运输

（1）冲洗培养基：加有 1%抗生素/抗真菌素和 0.1%庆大霉素溶液的 D-PBS（50 mg 硫酸庆大霉素/ml 蒸馏水；Invitrogen/GIBCO；cat. no. 15750060）。

（2）运送培养基：Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM）含有 1000 mg/L D-葡萄糖、谷氨酰胺、盐酸吡哆醇、110 mg/L 丙酮酸钠、3.7 g/L 碳酸氢钠，pH 6.7（低葡萄糖 DMEM；Invitrogen/GIBCO；cat. no. 31600-034）；20%胎牛血清；1%氢化可的松［0.04 mg/ml 为建议的工作溶液或 0.4 μg/ml 为终浓度②见 2.4.2 第（4）条］；1%抗生素/抗真菌素；0.1%庆大霉素溶液。

（3）70%乙醇。

---

① 原文此处为 2.2 第（8）条。——译者注

② 原文此处为终体积。——译者注

（4）15 ml 和 50 ml 无菌离心管（聚对苯二甲酸乙二醇酯；Corning；cat. no. 430055，430304）。

2.5.2 接收

角质形成细胞分离和传代的消耗材料见 2.4。

2.6 冰冻和融化有活力的细胞冻存物

2.6.1 冻存

（1）0.25%胰蛋白酶［见 2.2[①] 第（11）条］。

（2）小鼠角质形成细胞冰冻培养基（mKFM）：无 $CaCl_2$ 的 EMEM；8.33%（*V*/*V*）的二甲基亚砜（DMSO）（无内毒素，过滤除菌，MW 78.13；Sigma-Aldrich；cat. no. D2650）；20% cFBS，光敏感的；使用当天配制。

（3）95%乙醇，室温。

（4）3～4 lb[②] 的干冰。

（5）蛭石绝缘的大烧杯和外包聚氨基甲酸酯泡沫的冰桶（见后文图 1.1）：绝缘的大烧杯包括 1000 ml 的烧杯和其内的 600 ml 烧杯。这两个烧杯之间的间隔填有蛭石，并且间隔的顶部用石蜡密封［见注意事项（8）］。

（6）过滤袋（大小约 2.5 in×2.75 in[③]，由擦镜纸组成；用打开的曲别针或类似的金属丝悬吊在 95%乙醇中）。

（7）液氮制冷器，−196℃。

（8）聚苯乙烯血清学移液管［见 2.4.1 第（10）条］。

（9）1.8 ml NUNC 冻存管，内螺纹（Nalge Nunc International；cat. no. 368632）：每管含 10^6 个细胞。

2.6.2 融化

（1）需要按照 2.4.1 第（8）～（12）条加上 70%乙醇。

2.7 分化标记的诱导

（1）D-PBS［见 2.1 第（4）条］。

（2）1 mol/L $CaCl_2$ 溶液［见 2.2 第（2）条］。

（3）EMEM.06［见 2.2 第（9）条］。

（4）含有 0.15 mmol/L Ca^{2+} 的角质形成细胞生长培养基（KGM.15）：角质形成细胞生长培养基［KGM；BulletKit® 无 Ca^{2+}；Cambrex Bioscience，Walkersville，MD；cat. no. CC-3104；见注意事项（9）］；1 mol/L $CaCl_2$ 溶液，加 0.15 μl/ml 培养基，

---

① 原文此处为 2.3。

② 磅，1 lb=0.453 592kg。

③ 英寸，1 in=2.54 cm。

Ca^{2+}终浓度达 0.15 mmol/L。在 4℃遮光条件下，KGM.15 可储存一个月。

3 方法

操作应尽可能地在 IIA 型层流通风橱中进行，把污染的风险降至最低。

3.1 cFBS[1]

3.1.1 漂洗 Chelex 100 树脂［见注意事项（1)］

（1）加 1.3 L Milli-Q 去离子水到烧瓶或烧杯中。

（2）在搅拌 Milli-Q 去离子水的同时加入 200 g Chelex 100 树脂。

（3）用 HCl（3～6 mol/L）调节 pH 为 7.35～7.4。

（4）停止搅拌，静置 30 min 使 Chelex 下沉。

（5）小心倒掉去离子水，保留 Chelex。

（6）用 1.3 L Milli-Q 去离子水冲洗两次：加去离子水，搅拌 5 min，使 Chelex 下沉 30 min，然后倒掉去离子水。

（7）如步骤（6）用 1.3 L D-PBS 洗涤两次。最后一次用 D-PBS 洗涤时，在 Chelex 下沉之前，使 pH 稳定在 7.35～7.4。

（8）小心倒掉 D-PBS。

3.1.2 制备螯合处理的血清

（1）加 1 L 冰冷（4℃）的 FBS。

（2）4℃遮光（用铝箔包裹）搅拌 1 h。

（3）用 0.45 μm 孔径的过滤器过滤一次 cFBS 以去除残留的树脂，再通过 0.22 μm 孔径的过滤器灭菌。

（4）留出一个样本来测定 Ca^{2+}的浓度［见注意事项（4)］。

（5）标记并等份分装到 15 ml 或 50 ml 的无菌容器中，然后在－20℃遮光储存［见注意事项（10)］。

3.2 CM1

接下来的实验方案将需要 30～40 只小鼠，可生产 900～1200 ml 的 CM1。若所使用的小鼠少于 30 只，则需要调整胶原酶溶液的体积。

3.2.1 第 1 天

（1）获得活的新生小鼠。

（2）用无菌保险刀片切断小鼠头，在 70%乙醇中漂洗，再去掉四肢和鼠尾［见注意事项（11)］。

（3）从头部到尾部切开腹侧皮肤，可撕下一张完整的皮肤。

（4）用加有 2%抗生素/抗真菌素的 D-PBS 漂洗皮肤，并换液三次，以防止污染。

室温下皮肤浸没在 D-PBS 溶液中可保持 1 h。

(5) 在 100 mm 的培养皿中放置预切好的无菌 Whatman Grade no. 1 过滤纸，再直接将完整的皮肤展开在干的滤纸上，真皮面向下。确保皮肤的边缘不被卷曲。在一个 100 mm 的培养皿中可铺展开 5～6 个小鼠的皮肤。

(6) 每个培养皿中加入 7～10 ml 的冷 0.25%胰蛋白酶。

(7) 在 4℃下冷藏 16～18 h [见注意事项 (12)]。

3.2.2 第 2 天

(1) 用精细的无菌镊子分离表皮和真皮：表皮有光泽，相对薄并且是透明的；而真皮呈红色，相对较厚并且不透明 [见注意事项 (13)]。

(2) 将真皮片放在加有 5 ml 37℃胶原酶溶液的 60 mm 培养皿中 [见注意事项 (14)]。

(3) 用无菌的剪刀将真皮片剪成碎片并移至无菌锥形瓶中。

(4) 在无菌锥形瓶中加入 45 ml 37℃的胶原酶溶液，置于 37℃、5.0% CO_2 的保温箱里，敞开瓶口，搅拌 30 min [见注意事项 (15)]。

(5) 经无菌纱布过滤到无菌离心管中以去除真皮碎片。

(6) 200 *g* 离心 5 min 以沉降细胞，小心吸出上清液。

(7) 重悬于 HCM 中。每个 T150 组织培养瓶加有 25 ml HCM，可接种一个皮肤样本的细胞 [见注意事项 (16)]。

(8) 在 37℃、5%CO_2 的保温箱中培养 1 d [见注意事项 (17)]。

3.2.3 第 3 天

(1) 用 D-PBS 洗两次培养瓶以去除残留的钙。

(2) 加 30 ml EMEM.06，在 37℃、5% CO_2 的保温箱中培养 2 d。

3.2.4 第 4 天

继续孵育。

3.2.5 第 5 天

(1) 用 0.45 μm 孔径、500 ml 瓶顶状的过滤器过滤每个培养瓶中的 CM1 [见注意事项 (18)]。

(2) 等份分装到管或瓶中，储存在－20℃。一直保持结冰，直到需要用时才解冻，避免反复冻融 [见注意事项 (19)]。

3.3 小鼠 IV 型胶原包被培养皿

(1) 缓慢解冻小鼠 IV 型胶原的冻存瓶；将放有冻存瓶的冰盒置于 4℃中 (融化需时约 24 h)，强烈涡旋搅拌 15 s 以完全溶解。

(2) 用厂商提供的胶原浓度 (μg/ml) 数据计算每平方厘米所用胶原的微克数。以每个 60 mm 培养皿中加入 3 ml 胶原溶液为标准 [见注意事项 (20)]。在层流通风橱

中，用无菌的 0.05 mol/L HCl 将胶原溶液稀释到所需要的浓度。

（3）在组织培养皿中加入胶原工作液：1 $\mu g/cm^2$ 用于传代，5 $\mu g/cm^2$ 用于诱导分化和（或）收集细胞以提取蛋白质。可让培养皿在层流通风橱中放置 1 h。

（4）无菌去除胶原工作液，可储存供将来使用［见注意事项（21）］。

（5）用加有 1%抗生素/抗真菌素的 D-PBS 漂洗每个培养皿两次，以去除残留的盐酸。最后一次漂洗后，为去除更多的 D-PBS，应倾斜培养皿和彻底吸弃液体。

（6）立即使用；或用塑料膜包裹培养皿，几个放在一起包裹，在 4℃可储存 2 年。

3.4 角质形成细胞的分离和传代

3.4.1 原代培养

（1）将新生小鼠的皮肤悬浮在 0.25%胰蛋白酶中 4℃过夜，如同在 3.2.1 中所述［见注意事项（22）］。

（2）用无菌镊子分离真皮和表皮。

（3）将表皮放置在有 EMEM.06 的无菌离心管中（应是室温的 EMEM.06）：1～4 张皮肤可用含有 5～10 ml 培养基的 15 ml 试管一支；5 张或更多的皮肤用含有 10～20 ml 培养基的 50 ml 试管一支。

（4）用力振荡试管约 50 次以分离细胞［见注意事项（23）］。

（5）用无菌器械去除较大的表皮片。

（6）在血细胞计数器下计数细胞，200 *g* 离心 5 min。

（7）吸去上清液。小鼠角质形成细胞将黏附于玻璃上；用塑料吸管将细胞重悬于适当体积的 N-培养基中，按如下密度接种到胶原包被的培养皿：

1.0×10^6 个细胞/60 mm 培养皿/5 ml N-培养基 0.45×10^6 个细胞/35 mm 培养皿/2.5 ml N-培养基［见注意事项（24）］。

（8）37℃、4.5% CO_2 孵育［见注意事项（6）］。每隔一天用 5 ml 的 N-培养基/60 mm 培养皿和 2.5 ml 的 N-培养基/35 mm 培养皿换液，或每三天用 6 ml 的 N-培养基/60 mm 培养皿和 3 ml 的 N-培养基/35 mm 培养皿换液（例如，35 mm 培养皿在星期一用 2.5 ml 换液；在星期三传代，用 2.5 ml 换液；在星期五用 3 ml 换液），不能超过 2 d 不换液。

（9）当细胞完全铺满时（7～8 d）传代或提高钙浓度（见 3.7）。

3.4.2 传代培养

（1）用 D-PBS 轻轻冲洗。

（2）加 0.25%胰蛋白酶：2 ml/35 mm 培养皿；3 ml/60 mm 培养皿。

（3）37℃孵育 6～8 min。

（4）用塑料吸管加入等量的冷（4℃）EMEM.06 以吹打细胞和稀释胰蛋白酶，再将液体移到一个冷离心管中［见注意事项（25）］。

（5）用血细胞计数器计数细胞，200 *g* 离心 3～4 min。

（6）用塑料吸管吸去上清液，重悬于适当体积的 N-培养基中，以下列细胞密度接

种在胶原包被的培养皿中：

0.5×10^6 个细胞/60 mm 培养皿/5 ml N-培养基

0.2×10^6 个细胞/35 mm 培养皿/2.5 ml N-培养基。

(7) 37℃、4.5% CO_2 孵育。按前面描述的原代培养方法进行换液［见 3.4.1 第(8) 条］。

(8) 当细胞完全铺满时再次传代或提高钙浓度［每 7～8 d 传代一次，见注意事项(26)］。细胞可无定期传代；然而，在传至第 10 代时就会丧失晚期表皮分化标记（如丝聚合蛋白原和角蛋白 1）的表达[4]。

3.5 运送和接收小鼠皮肤

3.5.1 运送

(1) 如同 3.2.1 中 (1)～(4) 所描述的步骤处理新生小鼠皮肤。

(2) 用洗涤培养基漂洗皮肤，换液三次，以防止污染。在室温下皮肤可在洗涤培养基中浸泡 1 h。

(3) 每张皮肤放置于一个 15 ml 离心管中并注入运送培养基，4℃保存。运送培养基应该添加到离心管的顶部以保证整个皮肤被覆盖（留下一个小气泡以代偿在途中的可能压力改变）。

(4) 每张皮肤分别放置在装有运输培养基的单个试管中，盖紧并用封口膜密封。

(5) 将试管装在有冰袋的泡沫聚苯乙烯邮递容器中并加入隔热材料，如花生样聚苯乙烯泡沫。连夜快递运送，通知领受者知晓货物即将到达。

3.5.2 接收

(1) 小心打开试管并注意运输造成的任何损失［见注意事项 (27)］。

(2) 用无菌器械从运送培养基中取出皮肤，并用含有 1%抗生素/抗真菌素的 D-PBS 漂洗，更换几次洗涤液，以去掉残留的 FBS（钙）。

(3) 按 3.4 所描述的步骤进行处理。

3.6 冻存和解冻有活力的原代细胞储存物

3.6.1 冻存（见图 1.1）

(1) 如 3.4.2 的步骤 (1)～(5) 所述，用胰蛋白酶消化细胞。

(2) 吸出上清液，并用塑料吸管将细胞在 mKFM 中重悬为 10^6 个细胞/ml。mKFM 中残留的二甲基亚砜可能有细胞毒性，尤其是在室温或高于室温时，因此不允许细胞在冰冻培养基中停留太久（以开始冷冻操作之前不能超过 30 min 为限）。

(3) 将细胞悬液转到冻存管中，每管 1 ml（推荐的冻存密度是每管 10^6 个细胞）。将盖子密封好，但不要太紧，否则在稍后的解冻过程中容器可能会爆裂。

(4) 每个 2.5in×2.75in 的包埋袋中可直立放置的冻存管不能超过 3 只。

(5) 将放有搅拌棒的绝缘大烧杯放在有干冰的冰桶里，再把冰桶置于搅拌器上，烧杯中注入 95%乙醇，占烧杯体积的 1/2～2/3，开启搅拌器。

（6）用弯曲的曲别针悬吊装有冻存管的包埋袋于冰冻烧杯的边缘。每次所用的包埋袋最好不超过 4 个，每个袋中装有 3 只冻存管（或每次总共 12 只冻存管）。仅将细胞悬液浸没入乙醇中，而冻存盖应该完全高于乙醇液面。

（7）在冰桶内加入 95%乙醇使之稍低于冰冻烧杯内的乙醇液面（冰桶的液面将因后续加入的干冰块而上升）。

（8）把干冰块放入盛有 95%乙醇的冰桶中（不是烧杯中，目的是降低烧杯内的温度，约 1℃/min）[见注意事项（28）]。加入的干冰块在刚开始时应少量，以避免溢出，但应确保在整个操作中冰桶中都有可见的干冰块存在（定时检查）。

（9）1 h 后，测量冰冻烧杯内的温度。当冰冻烧杯中乙醇的温度已经达到－40℃或更低时（大约需 1.5 h），就可以将冻存管转移到液氮制冷器中。

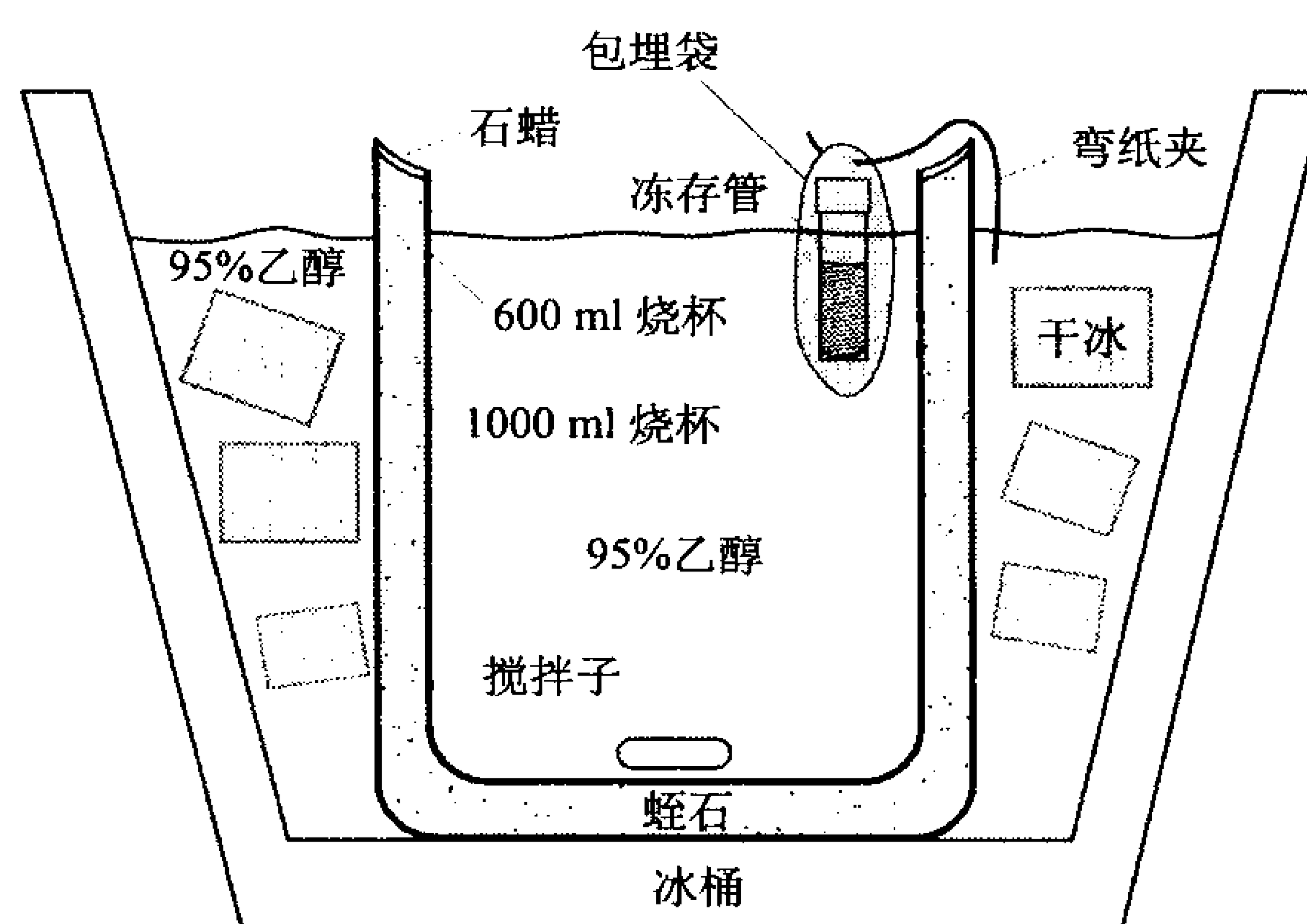


图 1.1　乙醇/干冰冷冻法

为了保证细胞的高活力，使用含有 DMSO 的冻存液和绝缘的容器以防止细胞脱水及冰晶的形成。本图描绘了一个高效的冰冻装置，可允许细胞悬液达到－40℃或以 1℃/min 的速度降低温度。

3.6.2　解冻

（1）在 60 mm 胶原包被的培养皿中加入 5 ml N-培养基，并置于 37℃、4.5% CO_2 培养箱中放置 1 h 使之平衡。

（2）从液氮中取出冻存管并立即浸没于 37℃水浴中 [见注意事项（29）]。

（3）一旦细胞悬液融化，就用 70%乙醇或类似的抗菌药物擦拭瓶盖周围，然后轻弹冻存管以重悬细胞，并用塑料移液吸头将冻存管内的细胞悬液转移到培养皿中。此外，DMSO 可能有细胞毒性，尤其是在较高温度时，因此不允许细胞长时间待在冻存液中。

（4）24 h 后换液，此后按正常的换液时间表继续换液培养细胞。大约 7～10 d 后细胞铺满时，就应该进行细胞的传代培养。

3.7　分化标记的诱导

（1）开始于 5 μg 胶原/cm^2 包被的培养皿中，以 N-培养基培养的融合细胞开始。

（2）用 D-PBS 轻轻漂洗两次。

（3）用正常换液量的 EMEM. 06 替换 N-培养基以清除细胞生长因子，在 EMEM. 06 中培养 24 h。

（4）再用 KGM. 15 换液，在 KGM. 15 中培养 48 h。

（5）用 D-PBS 轻轻漂洗两次，最后一次漂洗后尽可能多地吸去漂洗缓冲液。

（6）收集的细胞可用以提取蛋白质，或包装于铝箔中，并冻存于－80℃以备将来使用［见注意事项（30）］。

4 注意事项

（1）快速螯合法：不让 Chelex 100 树脂下沉，而是用配有 Whatman Grade no. 1 滤纸的布氏漏斗来过滤去离子水或 D-PBS。漂洗过程中，要确保树脂从滤纸上刮下并放回于烧瓶中，不能让树脂变得太干。钙快速螯合法可能导致滤纸中 Ca^{2+} 浓度轻度升高（—0. 25 mmol/L），但是这个结果仍然可接受。

（2）动物种属似乎不是问题。转基因小鼠角质形成细胞的培养不需要来自遗传学相同小鼠成纤维细胞的条件培养基（也就是可用正常小鼠的成纤维细胞来制作 CM1）。

（3）例如，含有 0. 134 mg/ml 钙的 FBS（由厂商提供浓度数据）：因为添加 FBS 的量为 7. 34%，则 HCM 中 Ca^{2+} 的浓度为 0. 25 mmol/L。配制 1 mol/L $CaCl_2$ 工作液，过滤除菌，每毫升 HCM 添加 0. 35 μl，可使 Ca^{2+} 终浓度为 0. 6 mmol/L。如能保持无菌和容器密封以阻止蒸发，$CaCl_2$ 工作液就可保存于 4℃达 2 年。

（4）当使用 cFBS 时，可用原子吸收光谱来测定 Ca^{2+} 浓度；在华盛顿大学医学中心临床实验室的直线性可延伸至 0. 009 mmol/L。请注意：相关实验室应该悉知送检样本的特性，以避免利用标准稀释法来测定血清的 Ca^{2+} 浓度。正常 cFBS 的 Ca^{2+} 浓度大约是 0. 25 mmol/L。

（5）为了得到最好的结果，我们推荐对多批次的胶原进行检测。我们通过订购来自同一厂商的 2～4 个批号胶原进行检验，用它们包被培养皿，并将小鼠表皮角质形成细胞在这些包被胶原的培养皿中传代 2～3 次，记录由吉姆萨染色集落镜检法测定的细胞黏附情况。我们选择可获得最佳细胞黏附的胶原批号。

（6）最好将小鼠表皮角质形成细胞维持在 4. 5% CO_2 中培养。我们推荐使用一种外置的 CO_2 分析仪，如 Fyrite® 气体分析仪（Bacharach, Inc. , Pittsburgh, PA; cat. no. 10-5000），以确定数字化 CO_2 培养箱的读数。

（7）为了节省时间，可以制备一种 2× 的添加剂溶液（2×E）。2×E 是用两倍体积的添加剂（20 μl/ml HC，2 μl/ml AG，2 μl/ml CT，0. 4 μl/ml EGF）溶解于 EMEM. 06 制成的，再与 CM1 行 1∶1 稀释以制备 N-培养基，在 4℃可保存长达 2 周。

（8）尽量保持石蜡密封膜处干燥，这是因为各层间的潮湿可能导致烧杯的破裂。

（9）我们从 Cambrex Biosciences 公司购买不含钙的 KGM，然后添加我们自己制备的 $CaCl_2$。如果要制备少量的培养基，应该将厂家提供的 KGM 试剂盒添加物进行分装，以减少冻融次数。

（10）cFBS 的保质期虽然未知，然而我们避光保存于－20℃长达 2 年且融化不超过

三次的储存物仍能有效地使用。

(11) 聚维酮碘对于角质形成细胞有毒性，在此操作中不应该使用。除在本章中所列出的抗菌药物制剂外，其他的抗菌药物尚未经过检验。

(12) 将培养皿放置在冷冻设备的金属网架上比放置在平坦的玻片或塑料架上更便于操作。确保冷冻设备尽可能在接近 4℃的情况下运行，16～18 h 的冷冻时间对于成功分离表皮至关重要。

(13) 表皮通常可以以一张完整的皮片撕脱下来。我们建议用一把镊子紧紧握住真皮层并用另一把去剥离表皮。温度变化、孵育时间及所用的酶都可能导致表皮难以剥离。如果皮肤在酶里消化时间过长，则导致基底细胞丢失且可观察到 DNA 的黏稠丝状物。

(14) 可将多达 40 只小鼠的真皮片放置于所述体积的胶原酶溶液中。如果表皮要用于获取角质形成细胞，那先剥离表皮并把真皮片保存于 D-PBS 中［见 3.4.1 步骤(3)～(9)］。当将表皮置于培养箱中消化时，可把真皮片转移到胶原酶溶液中继续 CM1 的操作。

(15) 我们在湿化培养箱（37℃、5.0% CO_2）内放置一个搅拌机，电源线可穿过培养箱顶部的一个开口插入。确保使用无菌的搅拌子（高压灭菌或浸没于 70%乙醇中灭菌）。

(16) HCM 仅用于接种成纤维细胞，确保在培养中无残留的角质形成细胞增殖。钙浓度应该精确（0.6 mmol/L）。当接种成纤维细胞时，可以每 1.0～1.5（译者注：原文此处为 10～15）张皮片用一个培养瓶，以确保添加 EMEM.06 时细胞不能铺得太满（例如，30 只小鼠的皮肤用 33 个培养瓶）。

(17) 成纤维细胞生长得很快。此步的目标是从处于活跃生长期的细胞收集条件培养基，因此当细胞大约铺满到 60%时要确保能继续实施第 3 天的实验计划（也就是在早上早点检查细胞，不能让收集 CM1 这一步骤操作推迟）。

(18) 一个过滤器可以抽滤大约 150 ml 的 CM1。在此操作的整个过程应牢记使用无菌技术。让空培养瓶直立 1 min 就可使残留的培养基流到瓶底，然后用移液管移去。

(19) CM1 保存 2 年仍可有效地使用。我们还没有系统地测试超过 2 年的 CM1。在融化并振荡到颜色一致后，可分装 CM1 溶液。

(20) 例如，Corning 60 mm 组织培养皿有 21 cm^2 的表面积，大约 3 ml 的胶原溶液能充分覆盖这类培养皿的底部。你将需要 105 μg/3 ml（35 μg/ml）的胶原工作液来包被这种培养皿（5 $\mu g/cm^2$），这一推荐的浓度是为了建立用于蛋白质提取的细胞培养方法。培养在 5 μg 胶原/cm^2 上的细胞不能成功地传代；用 1 μg 胶原/cm^2 培养的细胞可以传代。

(21) 在将胶原工作液再次冻存于－80℃之前可以将它保存在 4℃冰上达一周。推荐的解冻次数不超过三次。

(22) 对转基因小鼠来说，有必要在胰蛋白酶消化和收集（接种）角质形成细胞时都保持每只小鼠的皮肤分别处理，一直到确定每个小鼠的基因型。在处死小鼠时，可断离其尾部用于基因型的鉴定。

(23) 手持试管，在手掌上迅速地轻弹并重复约 50 次。一次可振荡三只 15 ml 或两

只 50 ml 的试管。更强烈的振荡（可从表皮片上充分地分离细胞）或已确认的酶（胰蛋白酶）活性可以提高细胞的收集数量。每张皮肤的细胞计数通常为（2～3）$\times 10^6$ 个细胞。

（24）大量的漂浮细胞是正常的，尤其是在早期传代时。

（25）此法不能完全灭活胰蛋白酶，且细胞不应该停留在此溶液中。在此细胞悬液中不用血清终止反应。我们没有测试过大豆胰蛋白酶抑制剂对小鼠角质形成细胞的作用。

（26）小鼠表皮角质形成细胞只有在铺满时才能传代，不像人表皮角质形成细胞那样在未铺满时传代。

（27）如果包装未达到运送条件所需的良好绝缘时，培养基可能会部分冻结或变暖至环境温度，从而导致细胞死亡。国际间的运输可能会导致一或两天的延迟，这也可能导致细胞活力降低。你可以通过增加细胞的接种密度来补偿，或对皮肤获得的细胞计数时采用台盼蓝测细胞活力。

（28）尽管这种冷冻方法是最佳的[5]，但其他常规的深低温保存技术（例如，在将冻存管转移到液氮中保存之前，先放置在一个密封的聚氨酯容器中于－80℃过夜）已得出可接受的结果。冻存管放置在液氮之前，应小心地以 1℃/min（降低到－40℃和－80℃之间）的速度来降低细胞悬液的温度可获得最好的结果。

（29）为了防止冻存管破裂，可将冻存管放在乳胶手套内，或在水浴箱上加上盖子。不要完全浸没冻存管，要确保仅仅是细胞悬液在水下。

（30）从 0.06 mmol/L 到 0.015 mmol/L 的 Ca^{2+} 浓度变化将会诱导某些表皮分化标记的表达。也可采用步骤（5）和（6）[3]来收集未诱导对照平皿中的细胞。

致　谢：此项研究得到了 NIH/NIAMS P01-AR-21557-20 和 Odland Endowed Research Fund 的支持。Jackie Bickenbach 博士为许多实验方案的建立提供了非常宝贵且必需的资料[3]。Mary Ann Derr、George M. Martin 和 Thomas H. Norwood 提供了深低温保存的技术。

（王丽华 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Brennan, J. K., Mansky, J., Roberts, G., and Lichtman, M. A. (1975) Improved methods for reducing calcium and magnesium concentrations in tissue culture medium: application to studies of lymphoblast proliferation in vitro. *In Vitro* **11**, 354—360.

[2] Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* **99**, 167—182.

[3] Tsao, M. C., Whithall, B. J., and Han, R. G. (1982) Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cell Physiol.* **110**, 219—229.

[4] Hager, B., Bickenbach, J. R., and Fleckman, P. (1999) Long-term culture of murine epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 971—976.

[5] Kang, S. J. and Fleckman, P. (1995) Convenient computer colony image analysis using anordinary flatbed scanner for evaluating keratinocyte cryopreservation methods (abstract). *J. Invest. Dermatol.* **104**, 612.

第 2 章　原代成年小鼠角质形成细胞的连续培养

Richard P. Redvers，Pritinder Kaur

摘　要：体外细胞培养是深入了解感兴趣细胞的生物学行为所必需的前提条件，同时也是开展细胞治疗的关键的第一步。成体干细胞生物学涉及成年个体的干细胞，以及如何将它们用于组织再生和减轻疾病。然而，疾病的发病率伴随年龄的增加而上升，因此成年个体的治疗需求最为迫切。由此可见，在体外培养和处理原代成年表皮角质形成细胞的能力，对获得与临床相关的皮肤生物学知识是至关重要的。一个可以使研究者分离小鼠表皮的成年基底角质形成细胞并在含有添加剂的培养基中连续培养多代的方法已经建立。该培养基可对上皮细胞系进行选择，在抑制细胞分化的同时增强细胞的增殖。

关键词：成体；鼠类；小鼠；尾部；角质形成细胞；表皮；皮肤；上皮；培养

1　导言

作为表皮的主要细胞，角质形成细胞已经成为我们了解皮肤生物学至关重要的许多原创性研究的焦点。培养上皮细胞的早期尝试困难重重，这是因为低于最适度的培养条件需要很高的接种密度，或不能维持角质形成细胞处于增殖状态，却允许间质细胞过度生长[1,2]。在补充血清的培养基中，使用照射过的成纤维细胞作为滋养细胞提出了这些问题[3]，尽管这些共培养系统难以阐释上皮细胞的精确营养需求及它们的内在能力。Ham 等[4~7]开发的 MCDB 培养基系列，在人角质形成细胞的无血清连续单一培养和冰冻储存中达到了顶峰。然而，小鼠角质形成细胞的培养系统因其独特的营养需求已经落后于人角质形成细胞。近年来，已描述的一种方法可允许新生小鼠角质形成细胞在补充添加剂的条件培养基中和在胶原包被的基质上连续传代[8]。后来，有报道显示来自胚胎皮肤的角质形成细胞用不太苛求的培养条件可以传代 60 次[9]。最近所描述的一种方法可允许来自 7 周龄小鼠的角质形成细胞在加有血清的条件培养基中短期传代[10]。在无血清或无条件培养基的条件下，来自稠密同种细胞的成年小鼠角质形成细胞的连续培养仍一直令人困惑，这部分归因于培养成年个体的细胞比培养它们相应新生个体困难得多[11,12]。在此详细描述的方法是利用成年小鼠尾部作为一个方便而丰富的毛囊间及毛囊基底层角质形成细胞的来源。从事成年小鼠皮肤生物学的研究者应对此感兴趣。

2　材料

2.1　器械

（1）两个细尖头的弯镊。

（2）手术刀柄和刀片（no. 22）。

（3）剪刀。

2.2 成年小鼠皮肤

（1）成年（≥8周）C57B6/J小鼠尾部的皮肤。

2.3 试剂

所有试剂用0.22 μm滤膜过滤法除菌，储存在4℃。除非有其他说明，整个操作过程保持在冰上进行。

2.3.1 皮肤的处理

（1）10%聚维酮碘溶液［相当于1%（*m*/V）碘］。

（2）PBS-AF（加有抗真菌和抗生素药物的磷酸盐缓冲盐溶液）：在1 L PBS中加入10 ml的青霉素（600 μg/ml)-庆大霉素（8 mg/ml）溶液和3 ml的氟康唑（2 mg/ml；Pfizer，France）。

（3）中性蛋白酶溶液：中性蛋白酶II（8 mg/ml，Roche；cat. no. 165 859）的PBS-AF溶液。临用前配制，0.22 μm滤膜过滤除菌。

2.3.2 基底层角质形成细胞的分离

（1）胰蛋白酶-乙二胺四乙酸（EDTA）（Thermo Trace Ltd.；cat. no. 21-160-0100V）。

（2）胰蛋白酶抑制剂（配制0.5 L)：无钙的DMEM［见注意事项（1)］；牛血清白蛋白（BSA）（经过组织培养检验；0.5 g）和大豆胰蛋白酶抑制剂（Sigma；cat. no. T9003；0.1 g）。

2.3.3 成年小鼠角质形成细胞的连续培养

（1）胶原（IV型来自于人胎盘，Sigma；cat. no. C5533)；用10 mmol/L乙酸配制成1 mg/ml的储存液［见注意事项（2)］。

（2）成年小鼠角质形成细胞生长培养基（AM-KGM；配制0.5 L)：角质形成细胞基础培养基（KBM，Clonetics，San Diego，CA；cat. no. CC-3101；0.5 L)，氢化可的松（HC；0.5 mg/ml无水乙醇，Sigma；cat. no. H0135；500 μl)，表皮生长因子（EGF；100 μg/ml PBS-AF/1% BSA，Sigma；cat. no. E4127；50 μl)，牛垂体抽提物（BPE；35 mg/ml，Hammond Cell Tech，cat. no. 1077；1 ml）［见注意事项（3)］，BSA（经过组织培养检验；1 g)，黄体酮（ITT；500×储存液；1 ml)。配制10 ml：胰岛素（6.25 mg/ml 12 mmol/L HCl，Sigma；cat. no. I1882；4 ml)，转铁蛋白（25 mg/ml双蒸水，Sigma；cat. no. T8158；1 ml)，三碘甲腺氨酸（T3，4×10^{-10} mol/L，Sigma；cat. no. T5516；5 ml)。

配制10 ml：

a. 在50 ml 0.02 mol/L NaOH中溶解13.6 mg T3。

b. 在 5 ml 双蒸水中稀释 50 μl T3（4×10^{-6}mol/L）。

c. 将 100 μl 4×10^{-6}mol/L T3 稀释在 9.9 ml 双蒸水中（4×10^{-8}mol/L）。

d. 将 100 μl 4×10^{-8}mol/L T3 稀释在 9.9 ml 双蒸水中（4×10^{-10}mol/L）。

e. EOP（500×原液；1 ml）。配制 10 ml：在 10 ml 双蒸水中加 30 μl 氨基乙醇（Sigma；cat. no. E0135）即为 50 mmol/L。在 10 ml 50 mmol/L 氨基乙醇中溶解 70.55 mg 邻位-磷酸乙醇胺（Sigma；cat. no. P0503）。

f. 硒（2.65×10^{-8}mol/L 双蒸水溶液，Sigma；cat. no. S9133；1 ml）。

g. 腺嘌呤（500×原液；1 ml）。配制 10 ml：在 5 ml 14 mol/L NaOH 中溶解 0.121 g 腺嘌呤（Sigma；cat. no. A2786），用 KBM 加至 10 ml（90 mmol/L）。

h. 黄体酮（500×原液；1 ml）。配制 10 ml：将 1 mg 黄体酮（Sigma；cat. no. P8783）溶解在 2 ml 双蒸水中；添加 62.9 μl 的 0.5 mg/ml 黄体酮在 10 ml 双蒸水中（3.15×10^{-3}mg/ml）；添加 1 ml 3.15×10^{-3}mg/ml 黄体酮在 9 ml KBM（1×10^{-6}mol/L）中。再添加下列成分：50 μl 霍乱毒素（用双蒸水配成 1 mg/ml，Sigma；cat. no. C8052）；100 μl 异亮氨酸 [用 1 mol/L HCl 配成 250 mmol/L，Sigma；cat. no. I7403，见注意事项（4）]；125μmol/L 酪氨酸（用 1 mol/L HCl 配成 124 mmol/L，Sigma；cat. no. T8566）；200μl 色氨酸（用 1 mol/L HCl 配成 37.5 mmol/L，Sigma；cat. no. T8941）；500 μl 组氨酸（用双蒸水配成 230 mmol/L，Sigma；cat. no. H6034）；2 ml 丙氨酸（用双蒸水配成 1.02 mol/L，Sigma；cat. no. A7469）；2 ml 苏氨酸（用双蒸水配成 312.5 mmol/L，Sigma；cat. no. T8441）；1 ml 青霉素（600 μg/ml）-庆大霉素（8 mg/ml）。

i. 1.5 ml 氟康唑（2 mg/ml 溶液；Pfizer）。

（3）将 KBM 和氢化可的松在 4℃避光储存。EGF 和 BPE 储存在－80℃可长达一年。所有其他的添加剂可无限期地储存在－20℃。将所有成分经 0.22 μm 滤器除菌，并分装储存。当所有成分均已添加时才过滤除菌培养基。不推荐重复过滤。

（4）EDTA：0.05% *m/V* 的 PBS-AF 溶液。

（5）胰蛋白酶-EDTA 和胰蛋白酶抑制剂同单独的操作步骤。

（6）台盼蓝溶液：0.4%（Sigma；cat. no. T8154）。

3 方法

这里所描述的试剂和材料是按比例用于 4 只成年小鼠尾部皮肤的收集。通过相应地按比例调整，这些试剂可用于不同数量的皮肤样本。

3.1 皮肤的处理

这部分介绍准备用于分离角质形成细胞的皮肤处理。一旦皮肤可用于实验，就必须无菌地处理组织，在处理过程中必须维持标本于低温（4℃）以保护细胞的活性。为了保持无菌，每次处理组织之前应先后用 70%乙醇和 PBS-AF 冲洗器械。在生物安全层流通风橱中做如下准备：在一个盛有 70%乙醇的大烧杯里浸没已经过高压灭菌的器械；盛有无菌 PBS-AF 的烧杯 1 个；盛有 10 ml 中性蛋白酶的 60 mm 有盖培养皿 1 个；盛有

约 20 ml PBS-AF 的 100 mm 有盖培养皿 2 个；鼠尾洗涤液（盛有 10 ml 聚维酮碘溶液的 15 ml 无菌 Falcon 管 1 只；盛有 10 ml PBS-AF 的无菌的 15 ml Falcon 管 4 只；盛有 10 ml 70%乙醇的 15 ml 无菌 Falcon 管 1 只）。

（1）吸入麻醉剂（如异氟烷）后用颈脱位法处死成年 C57B6/J 小鼠。将小鼠收集在盒子里并置于通风橱中。

（2）在一个无菌 100 mm 培养皿的倒置的盖上操作，用手术刀在离其身体几毫米的近端截断鼠尾。

（3）将鼠尾放在一个盛有 10 ml 聚维酮碘溶液的试管里，盖紧，反复倒置试管几次以予冲洗。

（4）把鼠尾转移至有 10 ml PBS-AF 的试管里，盖紧，并倒置试管几次以洗掉聚维酮碘溶液。重复几次。

（5）把鼠尾转移至有 10 ml 70%乙醇的试管里，盖紧，并如前倒置试管几次。

（6）把鼠尾转移至有 10 ml PBS-AF 的试管里，盖紧，并倒置试管几次以洗掉乙醇。重复几次。

（7）在一个 10 mm 无菌培养皿的倒置的盖上，用镊子夹紧鼠尾的近端，并用手术刀在断端的皮肤切一小切口。

（8）在切口处用镊子将皮肤与皮下组织分离开，使成一个约 1 cm 的皮瓣以便于夹持。

（9）用镊子夹紧切口深部尾软骨的同时，用另一个镊子更紧地抓住皮瓣，向远端平稳地拖移以剥离皮肤［见注意事项（5）］。把皮肤放入置于冰上且盛有 PBS-AF 的 100 mm 有盖培养皿里。

（10）一旦剥离完所有的鼠尾，将每个鼠尾皮肤切成等长的三份皮片，然后纵向切开较宽的近端皮片以制备出 4 个大致等大的皮片，转移至置于冰上且盛有新鲜 PBS-AF 的另一个 100 mm 有盖培养皿中。

（11）将所有的鼠尾皮片放在一个盛有 10 ml 中性蛋白酶的 60 mm 有盖培养皿中，用石蜡封口膜封闭，并在 4℃孵育过夜以溶解真皮-表皮的连接附件。

3.2 基底角质形成细胞的分离

这部分描述从中性蛋白酶处理的成年小鼠尾部皮肤分离基底角质形成细胞。如前准备层流通风橱，但不需要中性蛋白酶或鼠尾清洗液。

（1）分装 15 ml 胰蛋白酶抑制剂，保存在冰上。

（2）分装 10 ml 胰蛋白酶-EDTA 到一个 100 ml 的无菌玻璃广口瓶或烧杯中。将无菌的磁性搅拌子放入有盖的容器内并用封口膜密封。用前在 37℃水浴中预热至少 15 min。

（3）把中性蛋白酶消化的鼠尾皮片转移到盛有 PBS-AF 的 100 mm 有盖培养皿中，并彻底漂洗。

（4）在倒置的培养皿盖上放置皮片使其真皮侧向下，用镊子夹住一角，再用另一只镊子顺着毛囊的方向轻轻剥离表皮。将剥下的表皮片转移到新鲜的 PBS-AF 中，并彻底漂洗。中性蛋白酶处理可使带有完整毛囊结构的多毛表皮容易剥离，且毛囊角质形成细

胞丢失最少（图 2.1 A、B）。

（5）收集剥离的表皮片，将它们连续地排列在盖子的中央，并沿它们的长轴剪成不超过 4 或 5 个小片，注意不要剪碎。

（6）在平皿盖的侧边按压这些剪过的表皮片以挤出多余的 PBS-AF，用镊子将它们收集在手术刀片上，然后放入预热的胰蛋白酶-EDTA 中。立即放置在设定为 500 r/min 的磁性搅拌器上，准确搅动 4 min。

（7）立即把容器放置在冰上，用等体积的冷胰蛋白酶抑制剂溶液终止消化。

（8）用无菌剪刀剪去 25 ml 塑料移液管顶部约 5 mm 以预防在抽吸时阻塞，将表皮的糊状物经一个 70 μm 的细胞滤器（Becton Dickenson）滤入一个 50 ml 的 Falcon 管中。

（9）通过一个 40 μm 的细胞滤器把细胞悬液过滤到另一个 50 ml 的 Falcon 管中，再加入 5 ml 胰蛋白酶抑制剂，冲洗该滤器来收集任何残留的细胞。

（10）4℃、400 *g* 离心 5 min。倒掉上清液，轻轻地弹动试管以分散细胞沉淀物，使其再次悬浮在 1 ml 的 AM-KGM 中。反复用移液管吹打以分散细胞团，用冷培养基定容至 15 ml。

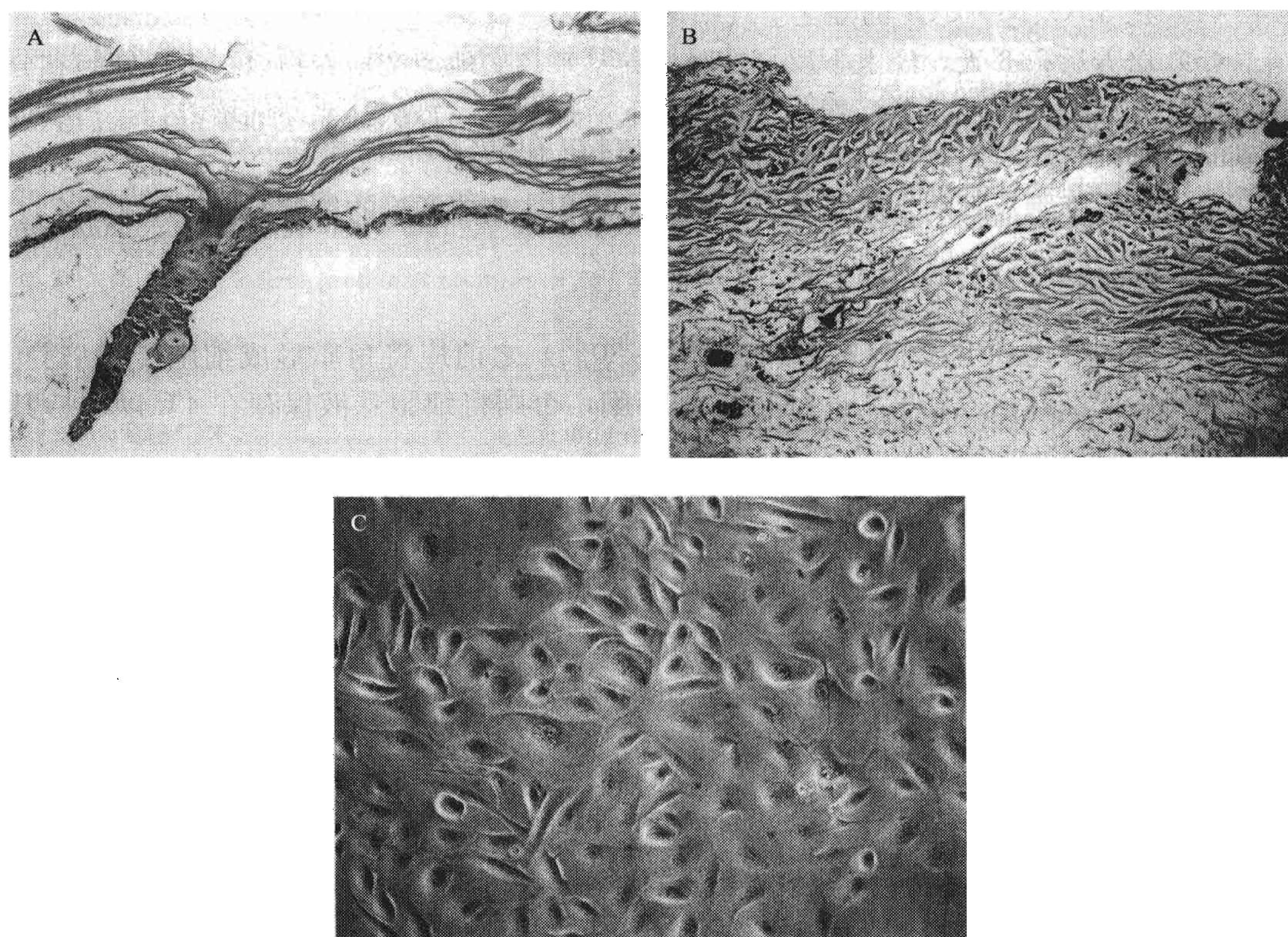


图 2.1　成年小鼠尾部的皮肤

中性蛋白酶处理后剥离的成年小鼠尾部表皮保留一层连续的基底角质形成细胞和包含膨隆区（一个已知的角质形成干细胞储藏部位）的完整毛囊皮脂腺单位（A）；非常少的表皮细胞残留在已剥离表皮的真皮中（B）；按 1∶5 的分瓶经 4 次传代的角质形成细胞（C）。

(11) 取少量细胞悬液用等容积的0.4%台盼蓝稀释，在血细胞计数板上计数活细胞。预期每个鼠尾有 $(6\sim8)\times10^6$ 个基底角质形成细胞，活力为85%～90%。

3.3 成年小鼠角质形成细胞的连续培养

这部分介绍的技术是在无血清培养基中和无成纤维细胞预处理的条件下连续培养来自于稠密同种细胞的成年小鼠角质形成细胞。

3.3.1 原代培养

(1) 在细胞分离之前，用PBS-AF配制的20 μg/ml IV型胶原包被组织培养瓶或培养板［见注意事项 (6)］。确保所使用液体的容积可覆盖整个表面。37℃孵育3 h或在4℃过夜。吸出胶原溶液并用PBS-AF轻轻地漂洗。

(2) 在胶原包被的基质上和AM-KGM培养基中以所需要的细胞密度接种，即1～10 000个细胞/cm^2。

(3) 选项：4℃、200 *g* 离心新接种的培养板5 min可以提高接种的效率［见注意事项 (7)］。

(4) 在37℃、5%CO_2 的湿化空气中培养。

(5) 培养后第3天，经上下反复抽吸培养基来彻底地漂洗培养物以移去死细胞和分化细胞。此后每周添加新鲜培养基三次，如前所描述的，每次都要漂洗培养物。当接近铺满时，必须每天给培养物换液以防止大范围的细胞分化。

角质形成细胞克隆的细胞在形态上呈紧密堆积、略成圆形的鹅卵石样（图2.1 C)。

3.3.2 传代培养

在广泛的分化或生长停滞（铺满60%～80%）之前应将角质形成细胞传代培养。若预计要传代培养，应在室温下迅速处理细胞，否则将细胞悬液保存在4℃以维持其活性。

(1) 用PBS-AF彻底漂洗培养的细胞两次。添加已预热的0.05%EDTA，其量足以覆盖整个细胞表面，并在37℃孵化10～15 min以启动细胞脱离。

(2) 当细胞间隙变宽时，弃去EDTA并加入预热的胰蛋白酶-EDTA以覆盖，37℃孵化10～15 min。

(3) 用移液管吹打以使细胞脱落，再将细胞悬液转移至离心管中。用等量预热的胰蛋白酶抑制剂洗涤培养瓶表面，收集残留的细胞，并与胰蛋白酶消化的细胞悬液混合以终止反应。

(4) 400 *g* 离心，5 min。

(5) 用移液管轻轻吹吸、重悬沉淀物，按所需要的密度在胶原包被的培养皿或培养瓶中接种细胞，如1/3、1/5、$10^3\sim10^4$ 个细胞/cm^2［见注意事项 (8)］。

(6) 选项：在带盖平皿的整个边缘用Micropore外科胶带（1.25 cm×9.1 m，3 mol/L; cat. no. 1530-0）密封以防止不慎将培养物暴露于空气中的情况发生。

这里所描述的培养体系允许培养来自克隆稠密的成年小鼠角质形成细胞，并以1∶5分瓶连续培养至少8代、超过2个月。经检验，以25 000个细胞/cm^2 接种在IV

型胶原上的真皮成纤维细胞不能在 AM-KGM 中生长，表明该系统对上皮细胞具有选择性。

4 注意事项

（1）可以用无 Ca^{2+} 的备选培养基替代 DMEM，因为小鼠角质形成细胞对 Ca^{2+} 浓度十分敏感。

（2）配制胶原时，缓慢滴加 10 mmol/L 乙酸并摇匀，4℃过夜使其溶解。在任何时候都必须保持胶原储存液于低温，以预防聚合。

（3）蛋白质浓度可能每批都不同，一旦按制造商的说明书对粗提取物进行了处理，则必须测定蛋白质浓度。分装到小瓶的数量应足以使最终的蛋白质浓度在 500 ml 培养基中达到 70 μg/ml。

（4）有些氨基酸可能需要微热和摇匀，以促其溶解。如果解冻分装品中的沉淀物在长时间的加热和涡旋振荡之后仍持续存在，则丢弃并另用一个新的分装小瓶。

（5）如果不能用镊子抓持皮肤，可以带上乙醇喷雾消毒的无菌手套，用手来剥离皮肤，对所提供表皮应多洗一次以确保清洁。

（6）我们在包被 IV 型胶原基质上的培养效果始终好于未包被的组织培养塑料瓶。然而，虽然后者的效率较低，但细胞可以直接接种在组织培养塑料瓶上。

（7）我们已经观察到将新分离的角质形成细胞离心沉降在它们的基质上可生长更好。实际上，悬浮培养的角质形成细胞启动了早期分化标记物的表达[13]，因此细胞有希望迅速地贴壁。

（8）如果预期的细胞数量少且需要计数，可用 500 μl 培养基重悬沉淀物后转移到一个新的 1.5 ml 微量离心管中，再用一个 500 μl 培养基回收原管的残留细胞，在新管中混合，450 *g* 离心 7 min。用吸管小心地抽吸上清液，并用适当容量的培养基重悬沉淀物。在铺满 60%～80%的细胞培养中，预计每平方厘米约 40 000 个细胞。例如，24 孔培养板的一个孔（1.8 cm^2）当铺满 80%时应该可收获约 60 000 个细胞。为了准确计数，重悬细胞为大约 10^6 个细胞/ml，在本例中即可重悬为 60μl。

致　谢：这项工作由国家健康和医学研究委员会（grant no. 145654）及澳大利亚维多利亚抗癌委员会资助。

（王丽华 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Laerum, O. D. and Boyum, A. (1970) The separation and cultivation of basal and differentiating cells from hairless mouse epidermis. A study of the specificity of the separation method by autoradiography, and the viability of the cells during cultivation in diffusion chambers. *J. Invest. Dermatol.* **54**, 279—287.

[2] Yuspa, S. H., Morgan, D. L., Walker, R. J., and Bates, R. R. (1970) The growth of fetal mouse skin in cell culture and transplantation to F1 mice. *J. Invest. Dermatol.* **55**, 379—389.

[3] Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the for-

mation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331—343.

[4] Peehl, D. M. and Ham, R. G. (1980) Clonal growth of human keratinocytes with small amounts of dialyzed serum. *In Vitro* **16**, 526—540.

[5] Tsao, M. C., Walthall, B. J., and Ham, R. G. (1982) Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cell. Physiol.* **110**, 219—229.

[6] Boyce, S. T. and Ham, R. G. (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 33s—40s.

[7] Boyce, S. T. and Ham, R. G. (1985) Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media. *J. Tissue Culture Methods* **9**, 83—93.

[8] Hager, B., Bickenbach, J. R., and Fleckman, P. (1999) Long-term culture of murine epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 971—976.

[9] Caldelari, R., Suter, M. M., Baumann, D., De Bruin, A., and Muller, E. (2000) Long-term culture of murine epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 1064—1065.

[10] Bickenbach, J. R. and Chism, E. (1998) Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp. Cell Res.* **244**, 184—195.

[11] Wille, J. J., Jr., Pittelkow, M. R., Shipley, G. D., and Scott, R. E. (1984) Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium: clonal analyses, growth kinetics, and cell cycle studies. *J. Cell Physiol.* **121**, 31—44.

[12] Tennenbaum, T., Yuspa, S. H., and Kapitulnik, J. (1990) Magnesium and phosphate enrichment of culture medium stimulates the proliferation of epidermal cells from newborn and adult mice. J. *Cell Physiol.* **143**, 431--438.

[13] Li, L., Tennenbaum, T., and Yuspa, S. H. (1996) Suspension-induced murine keratinocytedifferentiation is mediated by calcium. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 254—260.

第3章　无基质贴附下的角质形成细胞培养

Monika Jost，Ulrich Rodeck

摘　要：本章讲述在细胞不贴壁的情况下用液体培养基培养上皮细胞的实验方案和注意事项。现已证实此技术为研究缺少细胞外基质相互作用时影响上皮细胞生物学各个重要方面的一种强有力工具。尤其是本章所描述的这种在无基质贴附情况下观察细胞的实验，将允许研究者探究不依赖于细胞黏附的生长因子效应。本章还讨论了用于悬浮培养的组织培养皿制作方法，以及选择适当细胞培养基的方法。
关键词：不依赖支持物生长；角质形成细胞；黏附；生长因子；分化

1　导言

细胞对细胞外基质成分的黏附是表皮细胞生物学的一个重要内容。基质附着控制着细胞生理学的多个方面，包括细胞结构[1,2]、细胞周期进程[3,4]和细胞分化[5]。近年来人们已认识到，基质附着物也为包括角质形成细胞在内的上皮细胞存活所必需[6~9]。脱离基质的正常或永生化上皮细胞将发生凋亡，此过程又称为“失巢凋亡现象”[6]。基质的相互作用也许能限制转移过程中癌细胞的扩散速率，因此已引起科学家的浓厚兴趣。此外，在复层上皮（如表皮）的分层过程中，细胞从基底膜分离是终末分化程序的一部分。在分层表皮上层内的终末分化如何与失去接触基底膜所致凋亡相关的这一问题还有待解决。然而，研究基质锚定缺失所诱导的分子事件可能有助于辨认对分化和（或）凋亡起作用的基质依赖性过程。以下的简要实验方案描述了培养来自新生儿包皮的原代人角质形成细胞或 HaCaT 细胞（一种永生化角质形成细胞系）的悬浮培养方法[10]。这些实验的关键因素之一是培养基的组成，我们将单独介绍。防止上皮细胞贴附组织培养皿的一个关键步骤是用一种既阻止细胞贴附又防止具有黏附活性细胞外基质沉积的物质来覆盖塑料表面。这通常可通过将细胞接种于聚甲基丙烯酸羟乙基（聚 HEMA）或琼脂糖聚合物上来实现。这两种物质均能在不干扰细胞间接触的情况下，阻止基质附着和细胞外基质（ECM）的沉积。

2　材料

2.1　培养基的准备

（1）MCDB153 培养基（Sigma-Aldrich；St. Louis，MO；cat. no. M7403）。

（2）培养基用氨基酸（左旋体，细胞培养级，Sigma-Aldrich）：盐酸组氨酸（cat. no. H9511）；异亮氨酸（cat. no. I7383）；甲硫氨酸（cat. no. M2893）；苯丙氨酸

(cat. no. P5030)；色氨酸（cat. no. T0271)；酪氨酸（cat. no. T1145)。除酪氨酸保存在 4℃外，其余氨基酸均室温保存。

(3) 碳酸氢钠（Sigma-Aldrich；cat. no. S5761)。

(4) 氨基乙醇（Sigma-Aldrich；cat. no. E9508)。

(5) *O*-磷酸乙醇胺（Sigma-Aldrich；cat. no. 0503)。

(6) 氢化可的松（Sigma-Aldrich；cat. no. H0888)。

(7) 牛血清白蛋白组分 V，无热激蛋白和脂肪酸（Roche Diagnostics Corporation-Roche Applied Science；Indianapolis，IN；cat. no. 0100062)。

2.2 悬浮培养

(1) SeaKem LE 琼脂糖（Cambrex；Rockland，ME；cat. no. 50001)。

(2) 聚甲基丙烯酸羟乙基（聚 HEMA）(Sigma-Aldrich；cat. no. P3932)。

3 方法

3.1 用于不依赖支持物生长的细胞培养基

细胞培养基的选择是解释在液体悬浮培养中所见现象的关键。我们下面讨论的几个实例可以说明培养基的组成如何影响实验的结果。尽管不太可能确定用于液体悬浮培养实验的“金标准”培养基，但以下因素也许可作为设计培养基组成的起点。

3.1.1 用于观察生长因子和细胞因子在不依赖支持物生长和（或）凋亡中的效应的细胞培养基

为了检测生长因子和细胞因子对不依赖支持物的细胞周期进程和（或）凋亡的效应，必须有一种化学组成明确的基础培养基。在 3.1.3 中所描述的 MCDB153[11]就是这样一种合适的基础培养基，它以碳酸盐作为缓冲剂，包含必需氨基酸、氢化可的松、氨基乙醇和 *O*-磷酸乙醇胺。此培养基尽管不支持贴壁状态下角质形成细胞的细胞周期进程，但可保持细胞活性 48～72 h。可以按照实验设计的要求添加感兴趣的生长因子和细胞因子，推荐加入无脂肪酸的牛血清白蛋白作为细胞因子的载体蛋白，以避免因细胞因子与培养器皿表面的非特异性结合而导致其丢失。在常规培养中使用的任何不确定的成分，如牛脑垂体提取物、胎牛血清，应避免使用。市场上可得到的与 MCDB153 基础培养基相似的角质形成细胞培养基，只要它们不是专卖或不含未知成分，也可作为替代物来使用，并设计能确保角质形成细胞在贴壁培养中的最佳生长和成活。

3.1.2 用于观察细胞分化和细胞间黏附机制的细胞培养基

MCDB153 基础培养基以相对较低的 Ca^{2+} 浓度（29 μmol/L）区别于其他培养基，其目的是为了防止在常规培养条件下 Ca^{2+} 诱导的角质形成细胞分化。在悬浮培养中，Ca^{2+} 浓度高于 300 μmol/L 时肯定形成簇状或球状细胞聚集体，低 Ca^{2+} 的必然结果是防

止此二者的形成。这很有可能是 Ca^{2+} 在基于钙黏素的细胞间黏附起作用的结果[12,13]。实际上，低 Ca^{2+} 培养基的使用可以确保正常的角质形成细胞在悬浮培养中保持为单个细胞或疏松的聚集体，这种聚集体至少在悬浮培养的前 4 天内可以被温和的吹打所分散，因此在低 Ca^{2+} 细胞培养基中，不仅细胞与基质之间，而且细胞与细胞之间黏附所介导的信号事件均被阻断。如果希望出现细胞与细胞之间的黏附，则在基础培养基中补充 Ca^{2+} 至浓度高于 500 μmol/L 就可以使之恢复。应当注意市场上销售的角质形成细胞培养基所含 Ca^{2+} 的浓度范围。例如，GIBCO-Invitrogen 公司（Carlsbad, CA）的 KGM 培养基含 100 μmol/L Ca^{2+}，而 MCDB153 基础培养基仅含 29 μmol/L Ca^{2+}。我们观察到，悬浮培养的角质形成细胞在 KGM 培养基（GIBCO-Invitrogen）中的分化程度比 MCDB153 基础培养基中更高（结果未发表）。由于在悬浮培养中 Ca^{2+} 浓度与细胞的表型相关，因此这些差别强调了仔细考虑 Ca^{2+} 浓度的重要性［见注意事项（1）］。

3.1.3 MCDB153 基础培养基的准备

（1）将 MCDB153 基础培养基干粉（1 瓶可配的最终容积为 1 L）加于 900 ml 去离子水中搅拌，用少量去离子水冲洗干粉容器，并加入混合液中，搅拌使其溶解。

（2）加入 1.176 g 碳酸氢钠（Sigma; cat. no. S5761）。

（3）确保 pH 为 6.85。

（4）加入以下氨基酸：

氨基酸名称	终浓度/(μmol/L)	相对分子质量	每升培养基中的加入量/mg
组氨酸	2.4×10^{-4}	209.6	50
异亮氨酸	7.5×10^{-4}	131.2	98
甲硫氨酸	9.0×10^{-5}	149.2	13
苯丙氨酸	9.0×10^{-5}	165.2	15
色氨酸	4.5×10^{-5}	204.2	9
酪氨酸	7.5×10^{-5}	225.2	17

除酪氨酸保存在 4℃外，其余氨基酸均室温保存。

（5）搅拌至溶解（需要约 60 min），调整容积至 1 L。

（6）用 50%（*m*/*V*）的 NaOH 调整 pH 至 7.6。

（7）以 0.2 μm 过滤器过滤，等分为两个 500 ml，并保存于 −20℃。

（8）向 250 ml 的 MCDB 基础培养基中加入以下试剂：

		终浓度
250μl	氨基乙醇（0.1 mol/L）	0.1 mmol/L
250μl	*O*-磷酸乙醇胺（0.1 mol/L）	0.1 mmol/L
25μl	氢化可的松（5 mmol/L）	0.5 μmol/L

3.2 用于无黏附细胞培养的培养皿制备

3.2.1 方案A：聚甲基丙烯酸羟乙基包被平皿的制备

3.2.1.1 材料

(1) 95%乙醇。

(2) 组织培养基（见2.1）。

(3) 不同表面积规格的组织培养平皿（6孔板可适用于多种情况）。

(4) 不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲盐溶液（无菌）。

3.2.1.2 方法

(1) 用95%乙醇溶解聚甲基丙烯酸羟乙基并用力搅拌，配制成浓度为10 mg/ml的储存液。将溶液置于密封瓶中37℃过夜孵育可增加聚甲基丙烯酸羟乙基的溶解。室温下约500 *g* 离心30 min以去除未溶解物质［见注意事项（2）］。

(2) 在生物安全柜（biosafety cabinet）内用前述聚甲基丙烯酸羟乙基溶液包被平皿，约0.12 ml/cm^2（即6孔板每孔1 ml），并将平皿敞开置于生物安全柜内以使乙醇蒸发。

(3) 重复步骤（2）两次使表面完全覆盖。

(4) 用磷酸盐缓冲盐溶液（约0.25 ml/cm^2）洗板数次即可使用，未使用的平皿用塑料膜密封并置于4℃保存。

3.2.2 方案B：琼脂糖包被平皿的制备

3.2.2.1 材料

(1) 琼脂糖（分子生物学级）。

(2) 组织培养基（见3.1）。

(3) 尺寸合适的组织培养平皿（如6孔板）。

(4) 无脂肪酸牛血清白蛋白（备选，见3.1）。

3.2.2.2 琼脂糖包被平皿的制备

(1) 称取0.9 g琼脂糖加入100 ml培养基中（无生长因子培养基，见3.2.2.3）以制备0.9%（*m/V*）的琼脂糖储存液［见注意事项（3）］。

(2) 在微波炉中煮沸琼脂糖混悬液以溶解琼脂糖并消毒溶液，也可选择在液体状态下对琼脂糖溶液进行高压灭菌，应在凝固前使用。

(3) 在生物安全柜内用移液器将溶液加入培养皿，加入量约为0.24 ml/cm^2（6孔板每孔2 ml）。

(4) 将敞开培养皿置于生物安全柜内室温下至琼脂糖凝固。

(5) 至此该培养皿已可使用。若要储存，则每孔加入少量培养液（约0.2 ml/cm^2）以防止变干，用塑料膜密封后保存于4℃。

3.2.3 悬浮培养和细胞收集

(1) 胰蛋白酶消化细胞后，再用已建立的方法（如加入血清或大豆胰蛋白酶抑制

剂）灭活胰蛋白酶。

（2）用台盼蓝拒染法计数细胞，再用培养液重悬（根据实验条件确定培养基，见3.1.3）。推荐的起始细胞浓度为（3～5）$\times 10^5$ 个活细胞/ml（HaCaT 或正常角质形成细胞）。每孔（6 孔板）使用至少 2 ml 或更多细胞悬液，该使用量依赖于后续分析所必需的细胞数量。若使用 MCDB153 基础培养基（见前文），应加入 0.2%（m/V）的无脂肪酸牛血清白蛋白。

（3）按所设计的时间间隔，细胞可保持于悬浮状态中长达 72 h。如果需要孵育更长的时间，则需更换培养液，方法是离心细胞，用新鲜培养液重新悬浮细胞，再重新在琼脂糖上接种。

（4）当移取部分细胞用于分析时，先用血清学移液管温和吹打、混匀细胞悬液，再吸取所需体积进行细胞分析。

（5）若用于克隆形成的检测，吸取 50～100 μl 细胞悬液［（1.5～5）$\times 10^4$ 个细胞］，接种到 24 孔板内，用含所有添加物的最佳生长培养基培养。

（6）若用于分子生物学或生物化学分析（如 RNA 或蛋白质提取），则通过 400 *g* 离心收集足够的细胞数量，并进行相应的处理。

4 注意事项

（1）HaCaT 细胞在检测前应在角质形成细胞培养基中培养数天。用于常规培养 HaCaT 细胞的含血清培养基可能产生影响悬浮培养细胞活力或分化的残留效应，因此难以与单一生长因子的效应相区分。

（2）使用聚甲基丙烯酸羟乙基反复包被至少两次以上以完全覆盖培养器皿表面是非常必要的，未包被区域将导致细胞的部分黏附。在细胞数量已确定的情况下，这将成为一种潜在的误差原因。

（3）琼脂糖包被的培养板最好在制备后近期内使用，更长时间（即几天或更长时间）的保存将导致琼脂糖皱缩或裂缝。当发生这种情况时，悬液中的一些细胞可滑入琼脂糖下面并在塑料表面接触生长，正如上面所提到的一样，这也是一种潜在的误差原因。为重复使用，琼脂糖储存液一旦凝固可保存于 4℃，当需要更多的培养皿时，将其在微波炉中重新加热即可。应使用与实验所用培养基相似的一种培养基配制琼脂糖溶液以保持其成分的均衡，并关注其 Ca^{2+} 浓度。在琼脂糖溶液的配制中不推荐使用添加生长因子的培养基，这是因为高温（无论是高压灭菌还是微波）可使蛋白质变性。尽管尚无证据表明这对实验有负面影响，但会浪费昂贵的生长因子添加剂。

（王　勇译　彭代智校）

参考文献

［1］Wang, N., Naruse, K., Stamenovic, D., Fredberg, J. J., Mijailovich, S. M., Tolic-Norrelykke, I. M., et al. (2001) Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7765—7770.

[2] Ingber, D. E. (2003) Tensegrity II: how structural networks influence cellular information processing networks. *J. Cell Sci.* **116**, 1397—1408.

[3] Bottazzi, M. E., Zhu, X., Bohmer, R. M., and Assoian, R. K. (1999) Regulation of p21 (cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G_1 phase. *J. Cell Biol.* **146**, 1255—1264.

[4] Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M. E., and Assoian, R. K. (1999) Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3197—3204.

[5] Jones, J., Sugiyama, M., Speight, P. M., and Watt, F. M. (1996) Restoration of alpha v beta 5 integrin expression in neoplastic keratinocytes results in increased capacity for terminal differentiation and suppression of anchorage-independent growth. *Oncogene* **12**, 119—126.

[6] Frisch, S. M. and Francis, H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **124**, 619—626.

[7] Boudreau, N., Werb, Z., and Bissell, M. J. (1996) Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3509—3513.

[8] Rodeck, U., Jost, M., DuHadaway, J., Kari, C., Jensen, P. J., Risse, B., and Ewert, D. L. (1997) Regulation of Bcl-xL expression in human keratinocytes by cell-substratum adhesion and the epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5067—5072.

[9] Frisch, S. M. and Screaton, R. A. (2001) Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 555—562.

[10] Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761—771.

[11] McNeill, H. and Jensen, P. J. (1990) A high-affinity receptor for urokinase plasminogen activator on human keratinocytes: characterization and potential modulation during migration. *Cell Regul.* **1**, 843—852.

[12] Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K., and Takeichi, M. (1987) Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* **329**, 341—343.

[13] Wheelock, M. J. and Jensen, P. J. (1992) Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin. *J. Cell Biol.* **117**, 415—425.

第4章　基因修饰的饲养细胞在角质形成细胞培养中的应用

Takashi Kameda，Toshihiro Sugiyama

摘　要：在活的生物体中存在着许多细胞与细胞的相互作用，包括上皮细胞与间充质细胞的相互作用，它们调控细胞的生长与分化。这些相互作用系统的失调被认为是包括癌症在内的许多疾病的关键性发病原因。最近，分子生物学研究揭示了许多介导上皮细胞与间充质细胞相互作用的生长因子，这些生长因子是基础研究和医学应用的关键工具。然而，常难以获得纯化的生长因子蛋白。为了便于分析这些因子对角质形成细胞的生物学效应，在本章中我们描述如何将感兴趣的异位生长因子基因［如音猬因子基因（*Sonic hedgehog*）和 *wnt*-3 基因］导入 Swiss-3T3 细胞（该细胞是上皮细胞培养中最广为使用的一种饲养细胞），以及如何将它们与角质形成细胞共培养的方法。

关键词：角质形成细胞；饲养细胞；基因转移；音猬因子（Sonic hedgehog）；Wnt-3

1　导言

应用 Swiss-3T3 成纤维细胞作为饲养细胞，已建立了角质形成细胞培养的最经典和最成功的方法[1]。尽管当前已可用无血清培养基（钙离子浓度极低且含数种昂贵的生长因子）[2]来支持角质形成细胞的生长，但是 Swiss-3T3 成纤维细胞仍常常用于形成上皮的培养。这种方法关键的目的在于控制成纤维细胞的生长。

虽然成纤维细胞可以支持角质形成细胞的生长，但是其过度生长又反过来会抑制角质形成细胞的生长。为解决这个问题，常用 γ 射线照射或丝裂霉素 C 处理饲养细胞而使之不能繁殖分裂。这些不能增殖的成纤维细胞停止生长，为角质形成细胞的生长提供了良好的支持环境。尽管成纤维细胞所分泌因子的特性尚不清楚，但一些文献已提示了可溶性因子参与了这个过程，如角质形成细胞生长因子（一种成纤维细胞生长因子家族蛋白）和细胞膜相关丝裂原[3,4]。最近，对癌症和早期发育过程的分子生物学研究揭示了在角质形成细胞的生长与分化中更为关键的因子。

音猬因子（Sonic hedgehog，Shh）是在许多发育阶段如毛囊发育[5,6]中起作用的最重要因子之一。Shh 配体结合到 Ptc（Patched）跨膜受体家族（Ptc-1 和 Ptc-2）可活化另一跨膜蛋白 Smo（Smoothened）。在 Shh 信号缺失的情况下，Ptc 家族蛋白成员可抑制 Smo 的活性。脱阻抑的 Smo 可激活 Gli 家族的转录因子（Gli-1、Gli-2 与 Gli-3），进而调节靶基因的表达[7]。最近，已在遗传及散发型的人基底细胞癌及毛发上皮瘤中鉴定出编码 Shh 受体的 *ptc*-1 基因突变[8]。有人认为这些皮肤癌起源于极不成熟的角质形成细胞。现已知道通过活化表皮内的 Shh 信号可以在转基因小鼠中诱导这些癌症，提示

Shh 信号对未成熟的角质形成细胞具有很强的促有丝分裂效应。

Wnt 蛋白也是控制上皮细胞命运的最关键的因子之一。Wnt 蛋白结合受体细胞表面的 Frizzled（卷曲蛋白）家族受体。通过胞质内的几个中转成分，这些信号稳定了 β-连环蛋白，然后该蛋白质进入胞核与 T 细胞因子（TCF）形成复合物，进而激活 Wnt 靶基因的转录[9]。许多人类上皮癌存在 Wnt 信号途径基因的突变，提示该通路是决定角质形成干细胞命运的关键因素，如毛囊的形成[10]。

除了这些生长因子对角质形成细胞的生物效应之外，它们的应用可为改进组织工程技术提供强有力的支持。但是，目前难以获得大量具有生物活性的 Shh 或 Wnt 纯化蛋白，而且直接将这些致癌基因导入到角质形成细胞内有可能诱导癌症的发生。为解决这些问题，我们将异位基因导入 Swiss-3T3 细胞，通过共培养给角质形成细胞提供足够的生长因子，且不诱导角质形成细胞的基因改变（图 4. 1）[11]。

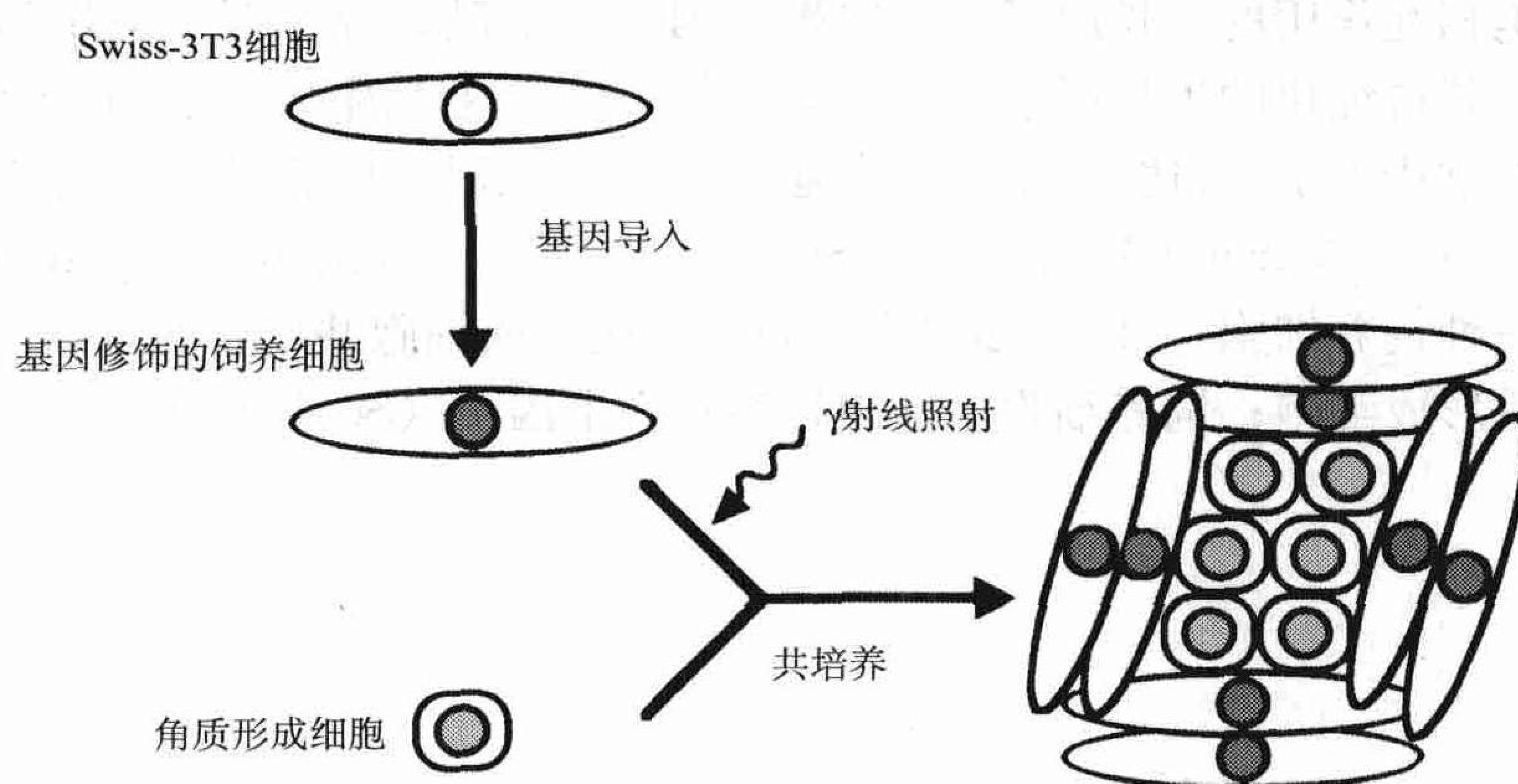


图 4. 1 实验的流程图

为了安全和容易地利用生长因子如 Shh 或 Wnt-3 蛋白刺激生长效应，将异位基因导入 Swiss-3T3 细胞，该细胞通常作为角质形成细胞的饲养细胞。将明确表达异位基因的饲养细胞经致死量的射线照射后用于支持角质形成细胞的生长。

2 材料

2. 1 细胞

（1）Swiss-3T3［可从大多数细胞库获得；见注意事项（1）］。

（2）人表皮角质形成细胞（Cell Applications，Inc.；cat. no. 102-05）。

2. 2 抗体

（1）抗-音猬因子蛋白抗体（Santa Cruz Biotechnology，Inc.，cat. no. sc-9024）。

（2）抗-HA-抗体（Santa Cruz Biotechnology，Inc.；cat. no. sc-805）。

（3）HRP 标记的抗兔 IgG 抗体（Amersham Bioscience；cat. no. NA934）。

2.3 培养基

2.3.1 Swiss-3T3

(1) Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM); Sigma, St. Louis, MO; cat. no. D 6046], 含 10%胎牛血清 (Sigma; cat. no. F 2442)。

(2) 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液: 含 0.05%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 的磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS)。

2.3.2 角质形成细胞

(1) 用于复苏: 精制的角质形成细胞无血清培养基 (DK-SFM) (Gibco; cat. no. 10744-019)。

(2) 用于共培养: 含有 10%胎牛血清的 DMEM、1.8×10^{-4} mol/L 腺嘌呤 (Sigma; cat. no. A 9795)、5 μg/ml 胰岛素 [Sigma, cat. no. I 9278 (10 mg/ml 溶液)]、0.5 μg/ml 地塞米松 (Sigma; cat. no. D 8893)、1×10^{-10} mol/L 霍乱毒素 (Sigma; cat. no. C 8052)、10 ng/ml 表皮生长因子 (Sigma; cat. no. E 9644), 以及 2×10^{-9} mol/L 三碘甲腺原氨酸 (Sigma, cat. no. T 5516)。

(3) 腺嘌呤 (100×): 将 0.1 g 腺嘌呤粉溶解于 30 ml 生理盐水中, 过滤, 冷冻保存于−20℃ (可稳定数月)。

(4) 地塞米松 (1000×): 将 1 mg 地塞米松粉溶解于 2 ml 乙醇中, 过滤, 冷冻保存于−20℃ (可稳定 1 年)。

(5) 霍乱毒素 (100 000×): 将 0.5 mg 霍乱毒素溶解于 50 ml 生理盐水中, 过滤, 冷冻保存于 4℃ [可稳定数月; 见注意事项 (2)]。

(6) EGF (1000×): 将 200 μg 表皮生长因子溶解于 20 ml 无菌生理盐水中, 冷冻保存于−20℃ (可稳定 1 年)。

(7) 三碘甲腺原氨酸 (10 000×): 将 1 mg 三碘甲腺原氨酸溶解于 74.3 ml 生理盐水中, 过滤, 避光冷冻保存于−20℃ (可稳定 1 年)。

2.4 基因转染与 G418 筛选

(1) 音猬因子表达载体 (从 T. Kameda 处获得; tkameda@med. akitau. ac. jp)。

(2) HA 标记的 Wnt-3 表达载体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; cat. no. 21-123)。

(3) LIPOFECTAMINE PLUS™试剂盒 (Invitrogen; cat. no. 10964-013)。

(4) Geneticin (G418, Sigma; cat. no. G 9516)。

(5) 硅脂处理过的克隆柱 (Sigma; cat. no. C 2059)。

2.5 蛋白质印迹

(1) 抽提缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% NP40,

以及 1% 脱氧胆酸盐水溶液。

(2) 橡胶细胞刮擦器。

(3) 蛋白质测定试剂盒 I (Bio-Rad; cat. no. 500-0001JA)。

(4) 2×样本缓冲液：0.2 mol/L Tris-HCl (pH 7.4)、4%十二烷基硫酸钠 (SDS)、10%β-巯基乙醇，以及 40%甘油的水溶液。

(5) 凝胶电泳

a. Shh 检测：用 15%聚丙烯酰胺凝胶，如 READY GELS J (15%; Bio-Rad; cat. no. 161-J341)。

b. Wnt-3 检测：用 10%聚丙烯酰胺凝胶，如 READY GELS J (10%; Bio-Rad; cat. no. 161-J321)。

(6) 电泳缓冲液：将 3.02 g Tris、14.4 g 甘氨酸及 1 g SDS 溶解于水中，定容至 1 L (加 SDS 前调 pH 至 8.3)。

(7) 转移缓冲液：从电泳缓冲液配方中去除 SDS。

(8) 电印迹系统。

(9) 电转印膜 (Immobilon Membrane, Millipore; cat no. IPVH000-10)。

(10) Whatman 3MM 滤纸 (Whatman; cat. no. 3030-917)。

(11) PBS-T：含 0.5% Tween-20 的 PBS。

(12) Western 阻断试剂溶液 (Roche; cat. no. 1-921-673)。

(13) ECL Western Blotting 检测系统 (Amersham; cat. no. RPN2209)。

2.6 角质形成细胞克隆的染色

(1) 固定液：用 PBS 配制 10%甲醛。

(2) Rhoda-Nile 溶液：1%罗丹明 B (Sigma; cat. no. R6626) 和 1% 尼罗蓝的水溶液 (Sigma; cat. no. N5632) (注意：罗丹明 B 是一种弱的致突变剂)。

2.7 表皮层的分离

(1) 分离液：含 10%胎牛血清和 1 U/ml 中性蛋白酶 (Invitrogen; cat. no. 17105-041) 的 DMEM。

3 方法

3.1 Swiss-3T3 细胞的培养

(1) 在每个 100 mm 的培养皿内铺种含 2×10^5 个细胞的培养基 10 ml。

(2) 细胞铺满程度达 80%时 (约接种后 3 d)，用 10 ml 37℃的胰蛋白酶-EDTA 液洗两次，37℃孵育 5～10 min，在 10 ml 的培养基中吹散、混匀；500 *g* 离心 5 min，弃上清，用 10 ml 的培养基重悬，细胞计数，在每个 100 mm 的培养皿内铺种含 2×10^5 个细胞的培养液 10 ml。重复步骤 (2)。

3.2　将异位基因转染 3T3 细胞

（1）将 2 ml 含 2×10^5 个细胞的培养液铺种在每个 35 mm 的培养皿（或 6 孔培养板的孔）内。接种后 18～24 h，细胞铺满度至 50%～80%。

（2）弃去旧的培养基，添加 1 ml 新培养基。

（3）将下述两管混匀。第 1 管：0.1 ml 无血清 DMEM，含 6 μl PLUS 试剂和 1 μg 质粒 DNA。第 2 管：0.1 ml 无血清 DMEM，含 4μl Lipofectamine 试剂。15 min 后，将此混合液加入细胞培养皿中。

（4）转染 3 h 后加入 3 ml 新培养基，第二天换液。

（5）转染后 2 d，将培养的细胞转移到新培养皿（1∶10～1∶20）。转染后 3 d 换含 G418（400μg/ml）的培养基。每 3 天换液一次。

（6）如果转染成功，在筛选后 1～2 周可在死细胞中间见到小而有活性的细胞集落。用克隆柱挑选这些集落进行克隆增殖。

3.3　蛋白质印迹检测异位蛋白（Shh 或 Wnt-3）的表达

（1）将 3.2 中转染和筛选出的细胞接种于 60 mm 培养皿中生长至铺满［见注意事项（3）］。

（2）用冰冷的 PBS 洗两次培养皿。加 0.1～0.2 ml 的抽提缓冲液，用橡胶细胞刮擦器刮下细胞并混合均匀。将抽提物转到 1.5 ml 微量离心管中，离心（10 000 r/min，5 min），收集上清。

（3）用带蛋白质标准的蛋白质定量试剂盒测定抽提物的蛋白质含量。

（4）用抽提缓冲液使样本的蛋白质浓度均等，加相同体积的样本缓冲液，混匀，煮沸 5 min。将储存的样本置于冰箱。

（5）用合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶（Shh 用 15%，Wnt-3 用 10%）对样本和蛋白质分子质量标准进行电泳。根据每台电印迹仪的操作手册将蛋白质转到电转印膜上。我们推荐 2.5 所描述的转移缓冲液。

（6）用合适的封闭液封闭膜 30 min。我们不推荐用粗制的脱脂牛奶。用 PBS-T 洗膜后，转移到合适的杂交袋内，加入 PBS-T 稀释的一抗（稀释的抗 Shh 抗体浓度为1∶500，抗 HA 抗体为 1∶100），室温下孵育 1 h。

（7）用 PBS-T 洗膜三次，每次 10 min。将膜转移到杂交袋，加 HRP 结合的二抗（我们推荐用 PBS-T 稀释为 1∶1000），室温下孵育 1 h。

（8）用 PBS-T 洗膜三次，每次 10 min。根据操作手册用 ECL 蛋白质印迹检测系统测定靶蛋白条带。选择高水平表达转基因蛋白的细胞克隆用于实验。

图 4.2 所示为 Shh 和 Wnt-3 表达细胞的代表性结果。

3.4　制备用于共培养的饲养细胞

（1）在 100 mm 的培养皿中培养饲养细胞至生长铺满，用 50～70 Gy 的 γ 射线照射处理细胞培养物。

（2）胰蛋白酶-EDTA 液消化细胞后，每个 60 mm 的培养皿接种含 4×10^5 个细胞的

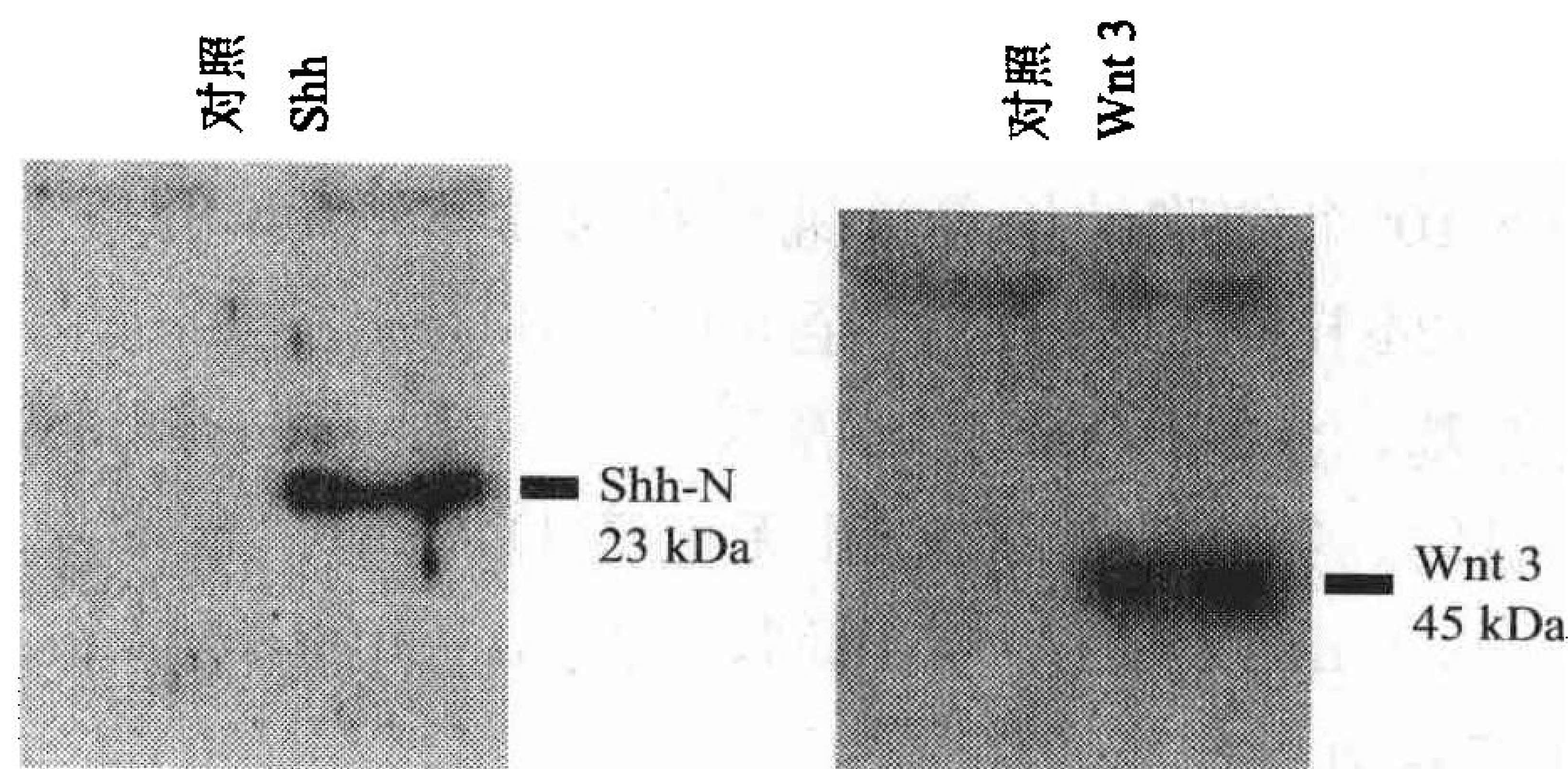


图 4.2　Shh 和 Wnt-3 蛋白在 Swiss-3T3 细胞的异位表达

培养基进行共培养。

如果你没有合适的辐照仪，可使用下面的替代方案：每个 60 mm 的培养皿接种 (3～4)×10^5 个饲养细胞。次日，用培养基配制的浓度为 4 μg/ml 的丝裂霉素 C (Sigma; cat. no. 50-07-7) 处理细胞 4 h [见注意事项 (4)]。用培养液洗三次，将培养液换为共培养用的培养液。

图 4.3 显示照射后细胞形状的形态学变化。

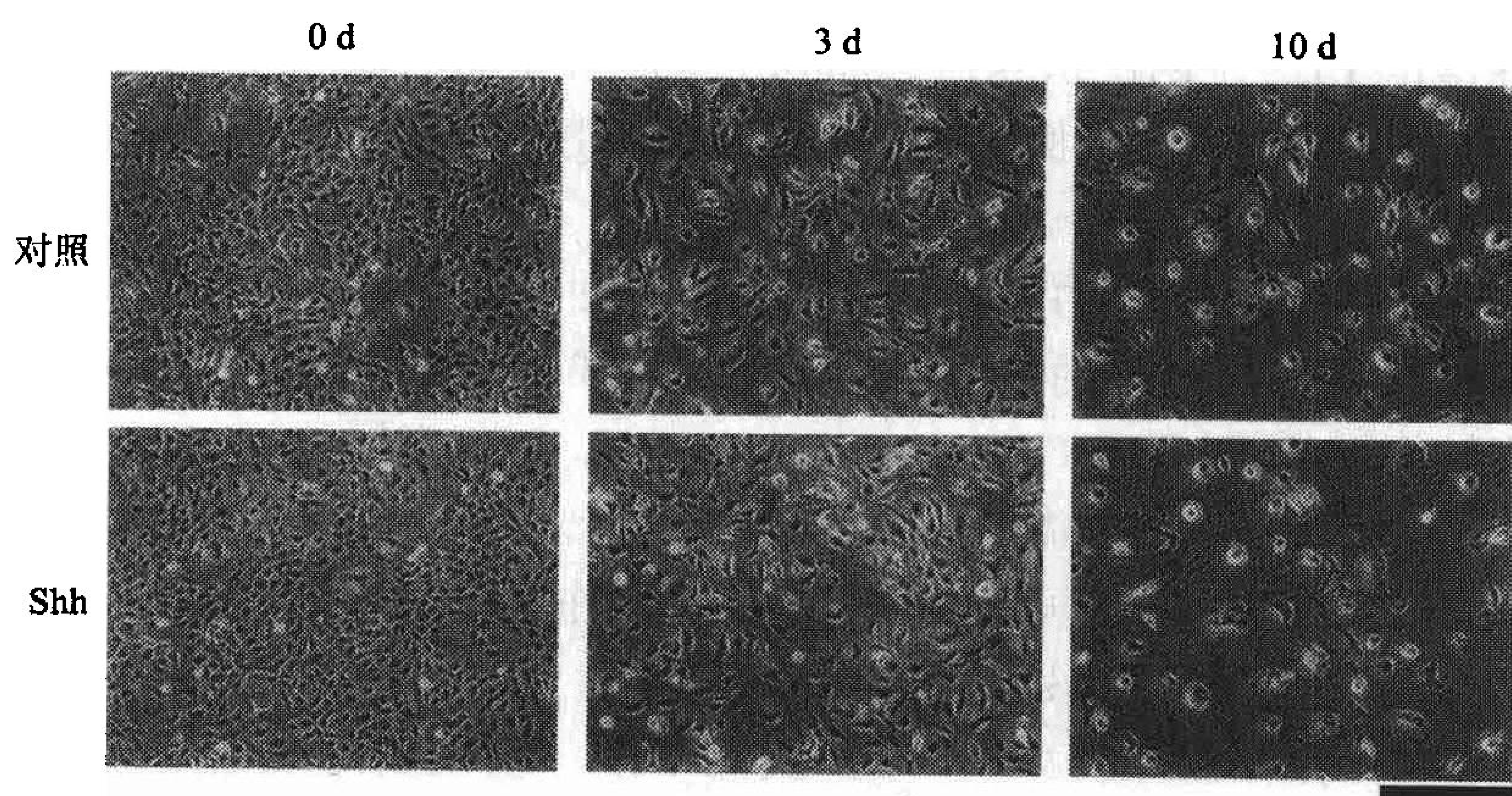


图 4.3　γ 射线 (70 Gy) 照射后对照与表达 Shh 的 Swiss-3T3 细胞的形态学变化
0 天的图像显示照射前细胞的形状。照射过的细胞逐渐肥大、脱落。标尺＝150 μm。

3.5　人角质形成细胞与饲养细胞的共培养

(1) 参照厂商的操作手册复苏人角质形成细胞。让人角质形成细胞在复苏培养液中生长 2～3 d。

(2) 根据 3.4 的方法准备饲养细胞。

(3) 用胰蛋白酶-EDTA 液清洗培养的角质形成细胞，室温下孵育 5 min，用橡胶细胞刮擦器收集细胞。用冰冷的 PBS 洗细胞两次，计数细胞，培养液重悬后用于共培养。在准备好的饲养细胞上接种适当数目的细胞 ([见注意事项 (5)]，我们常接种 5000～

40 000 个细胞），一周换液两次。

3.6 角质形成细胞克隆的染色

（1）PBS 洗细胞培养物两次，室温下用固定液固定 30 min。

（2）弃去固定液，加入 2 ml Rhoda-Nile 液，在室温下轻轻摇培养皿 10 min。将培养皿放入杯中用自来水冲洗数分钟。确认角质形成细胞集落着色后停止洗涤。将培养皿的水沥尽，晾干。

表达 Shh 饲养细胞与正常细胞的饲养效应染色结果的对比见图 4.4。

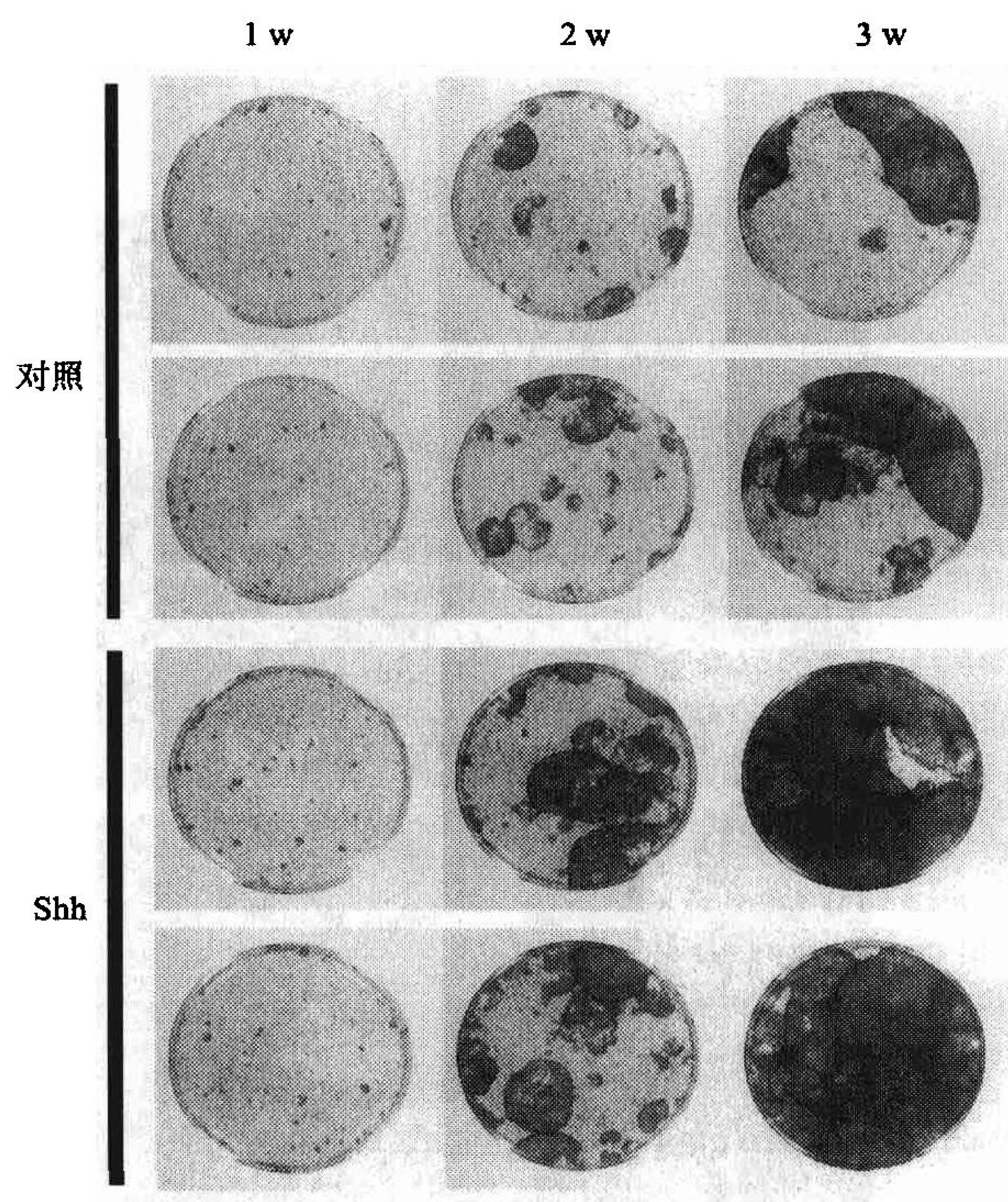


图 4.4　表达 Shh 的 Swiss-3T3 细胞与对照细胞在致死量照射后的饲养效应对比

角质形成细胞接种 1 周（1 w）、2 周（2 w）和 3 周（3 w）后分别对细胞培养物进行固定和染色。

3.7 从培养皿中分离角质形成细胞片

将培养基换为分离液，在二氧化碳孵箱内孵育 30 min，用两把镊子剥离细胞片。图 4.5 所示为表达 Shh 的饲养层细胞所饲养的角质形成细胞片在剥离后的垂直切面。

3.8 附录：表达 Shh 或 Wnt-3 的饲养细胞对角质形成细胞的效应

（1）如图 4.4 所示，使用表达 Shh 的饲养细胞可有效地加速角质形成细胞的生长。显微观察显示，在与表达 Shh 的饲养细胞共培养过程中，存在许多由小体积细胞组成的角质形成细胞集落（图 4.6）。

（2）尤其是在与表达 Wnt-3 的饲养细胞共培养中，我们观察到形状特别的角质形成

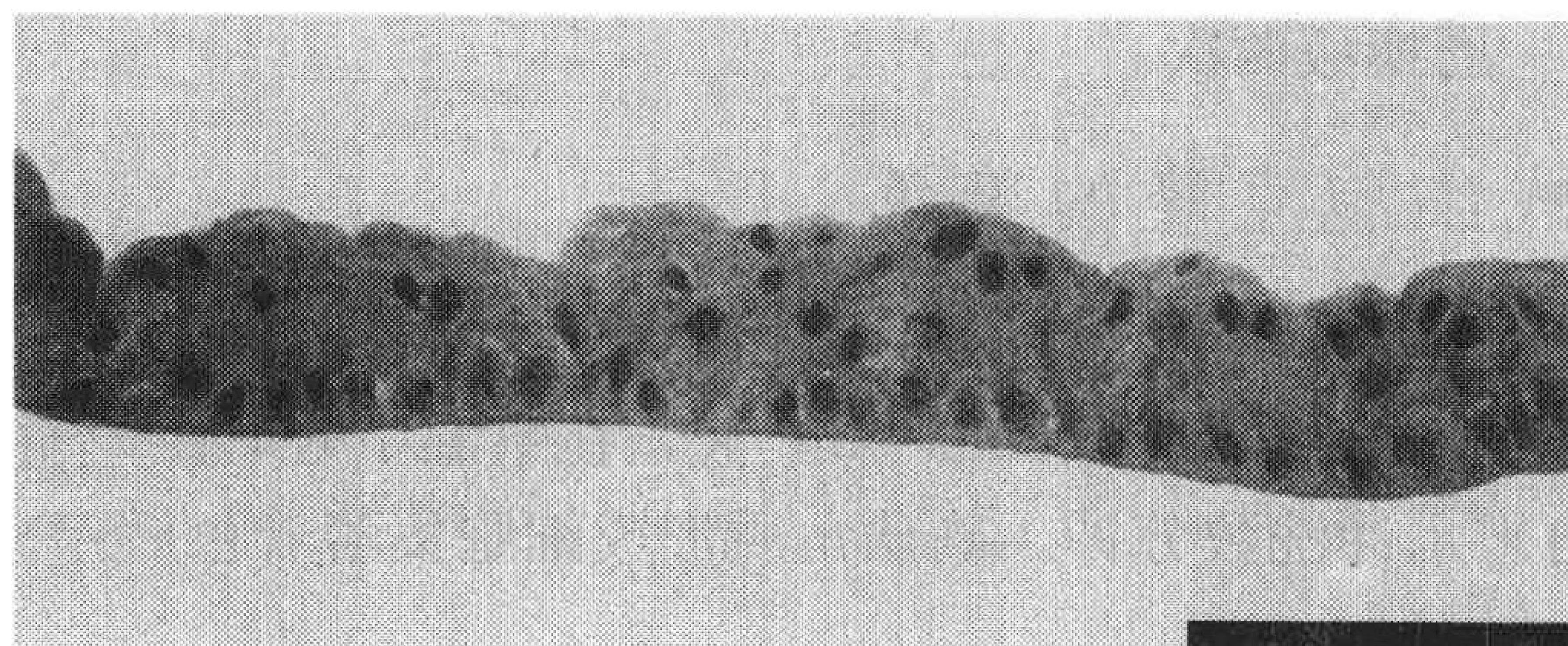


图 4.5　表达 Shh 的饲养细胞所饲养的培养表皮的垂直切面

角质形成细胞接种后 27 d，经中性蛋白酶处理从培养皿上分离出细胞片层，固定，石蜡包埋，切成 10 μm 厚。切片用 HE 染色。标尺＝ 100 μm。

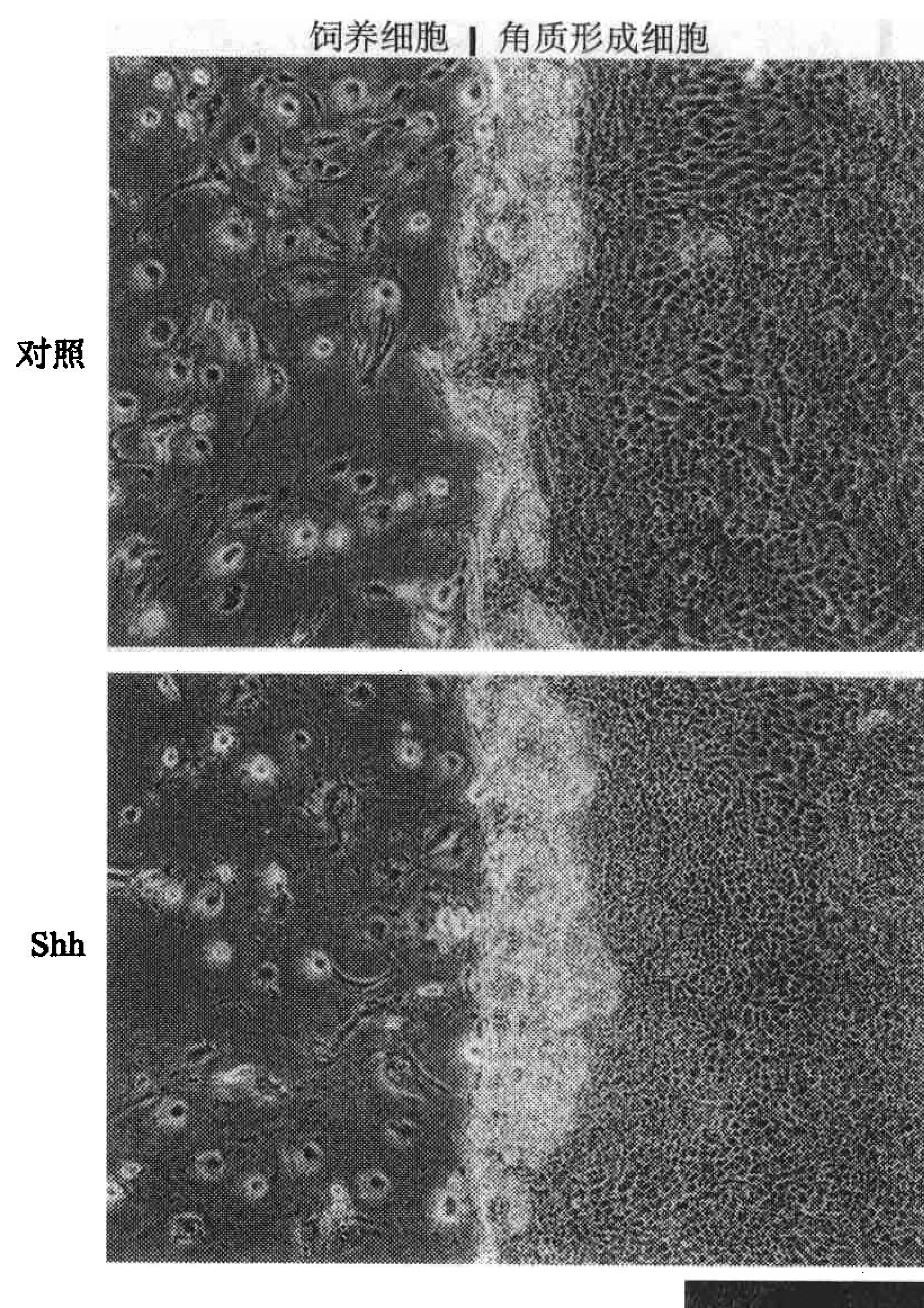


图 4.6　在显微镜下观察生长良好的角质形成细胞集落

上图为对照细胞作饲养细胞，下图为表达 Shh 的细胞作饲养细胞。接种角质形成细胞后 2 周，可筛选到生长良好的代表性集落，并对其周边区域进行拍照。标尺＝500 μm。

细胞集落（紧密的细胞间黏附消失，如图 4.7 所示），而不明显影响角质形成细胞的生长（未显示的资料）。这些变化可能与上皮-间充质转变有关，包括细胞极性的消失、细胞形状变长和侵袭能力的获得[12]。

我们推测对 Shh 和 Wnt-3 信号两者均起反应的角质形成细胞可能代表细胞群体的一小部分，而且非常不成熟，这必须经进一步的分析来证实。

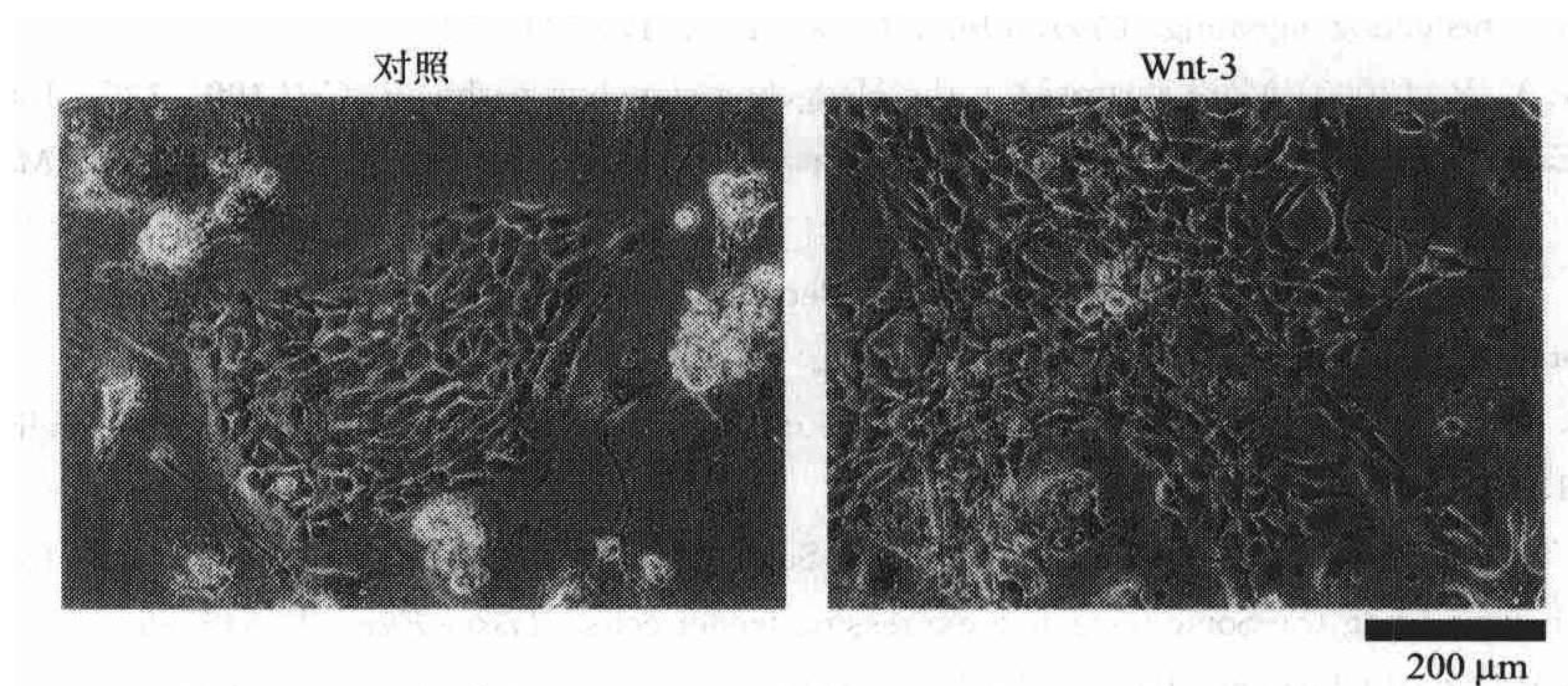


图 4.7 表达 Wnt-3 的饲养细胞对角质形成细胞集落形状的效应（接种后 7 d）
仅在与表达 Wnt-3 的饲养细胞共培养时有限制的细胞群体中可观察到紧密的细胞间黏附消失。标尺＝200 μm。

4 注意事项

（1）Swiss-3T3 不是一种克隆细胞系。如果要使比较分析的基因背景相同，我们必须建立优良的细胞克隆作为饲养细胞。

（2）在我们的实验中，太强的生长刺激因素可以自相矛盾地导致细胞衰老或凋亡。我们相信添加霍乱毒素能有效地减弱和控制 Shh 的强大效应，霍乱毒素通过激活 PKA 进而抑制 Shh 的信号转导。

（3）记住维持培养物的备份或冰冻储存细胞！

（4）请协调适当的处理时间。处理太久会导致细胞迅速死亡，太短的处理不足以使细胞生长停止。

（5）购买的角质形成细胞质量不稳定（包括细胞活力与分化状态），这意味着我们必须核对质量，为每批细胞建立合适的实验条件。

（王 勇 译 彭代智 校）

参 考 文 献

[1] Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331—343.

[2] Boyce, S. T. and Ham, R. G. (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 33s—40s.

[3] Werner, S. (1998) Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 153—165.

[4] Yaeger, P. C., Stiles, C. D., and Rollins, B. J. (1991) Human keratinocyte growth-promoting activity on the surface of fibroblasts. *J. Cell Physiol.* **149**, 110—116.

[5] Oro, A. E. and Scott, M. P. (1998) Splitting hairs: dissecting roles of signaling systems in epidermal development. *Cell* **95**, 575—578.

[6] Callahan, C. A. and Oro, A. E. (2001) Monstrous attempts at adnexogenesis: regulating hair follicle progenitors

through Sonic hedgehog signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 541–546.

[7] McMahon, A. P. (2000) More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* **100**, 185—188.

[8] Bale, A. E. and Yu, K.-P. (2001) The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 757—762.

[9] Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M., and Perrimon, N. (2002) The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**, 1644—1646.

[10] Fuchs, E., Merrill, B. J., Jamora, C., and DasGupta, R. (2001) At the roots of a never-ending cycle. *Dev. Cell.* **1**, 13—25.

[11] Kameda, T., Hatakeyama, S., Terada, K., and Sugiyama, T. (2001) Acceleration of the formation of cultured epithelium using the Sonic hedgehog expressing feeder cells. *Tissue Eng.* **7**, 545—555.

[12] Savagner, P. (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* **23**, 912—923.

第5章 胎鼠皮的器官培养及其在形态发生分子机制研究中的应用

Mariko Kashiwagi，Nam-ho Huh

摘 要：本章我们介绍一种体外器官培养的方法，可以使从受孕 12.5 d 或 13.5 d 的小鼠胚胎中分离出的皮肤组织在组织结构和时间顺序上发生与体内过程相类似的发育。在这个培养系统中，表皮生长因子特异且完全地抑制了毛囊的形成，并对毛囊间表皮仅产生微小影响。使用腺病毒载体可以将基因转导入表皮和真皮细胞层而没有明显的毒性作用。

关键词：器官培养；皮肤；发育；腺病毒

1 导言

由于无法接触子宫内的胚胎，有关阐明哺乳动物形态发育分子机制的研究受到了限制。解决该难题最实际而又有效的方法之一是器官培养。各种器官，包括肺[1]、牙[2]、肾脏[3]和乳腺[4]，都已被证明可以在多种器官培养系统中进行发育，其过程与体内基本类似。

在受孕 13.5 d 的小鼠胚胎中，表皮系统由简单的表皮细胞层和周皮组成。在受孕 14.5 d 时，毛芽和毛囊雏形表现为表皮局部的增厚，其周围有间充质细胞的聚集[5]。一旦形成，毛芽就不断生长延长，并穿入真皮组织。毛囊间表皮发生分层并逐渐分化形成角化层，最终在受孕 16.5 d 时从表面脱离。这样，小鼠胚胎皮肤从受孕 13.5 d 到 16.5 d 的发育就包括了形态发生中最重要的过程，即模式形成、细胞命运的确定、生长控制、分化、特定细胞亚群的凋亡及组织重构等。

这里，我们将介绍怎样体外培养受孕 12.5 d 或 13.5 d 的小鼠胚胎皮肤，并保持与体内过程相类似的生长发育 3～4 d[6]。通过这个系统，研究人员可以控制形态发育的进程，从而可以进行分子机制的相关研究。此外，我们还叙述了将基因转导入体外培养皮片的过程。

2 材料

2.1 小鼠胚胎皮肤的分离和处理

(1) 选取特定受孕天数的小鼠（12.5 d 或 13.5 d)。

(2) 立体显微镜（Carl-Zeiss 公司，Stemi 2000-C；或同级别产品）和解剖盘。

(3) 解剖工具：精细镊（可向当地供应商购买)；剪刀（一把是常规尺寸，另一把

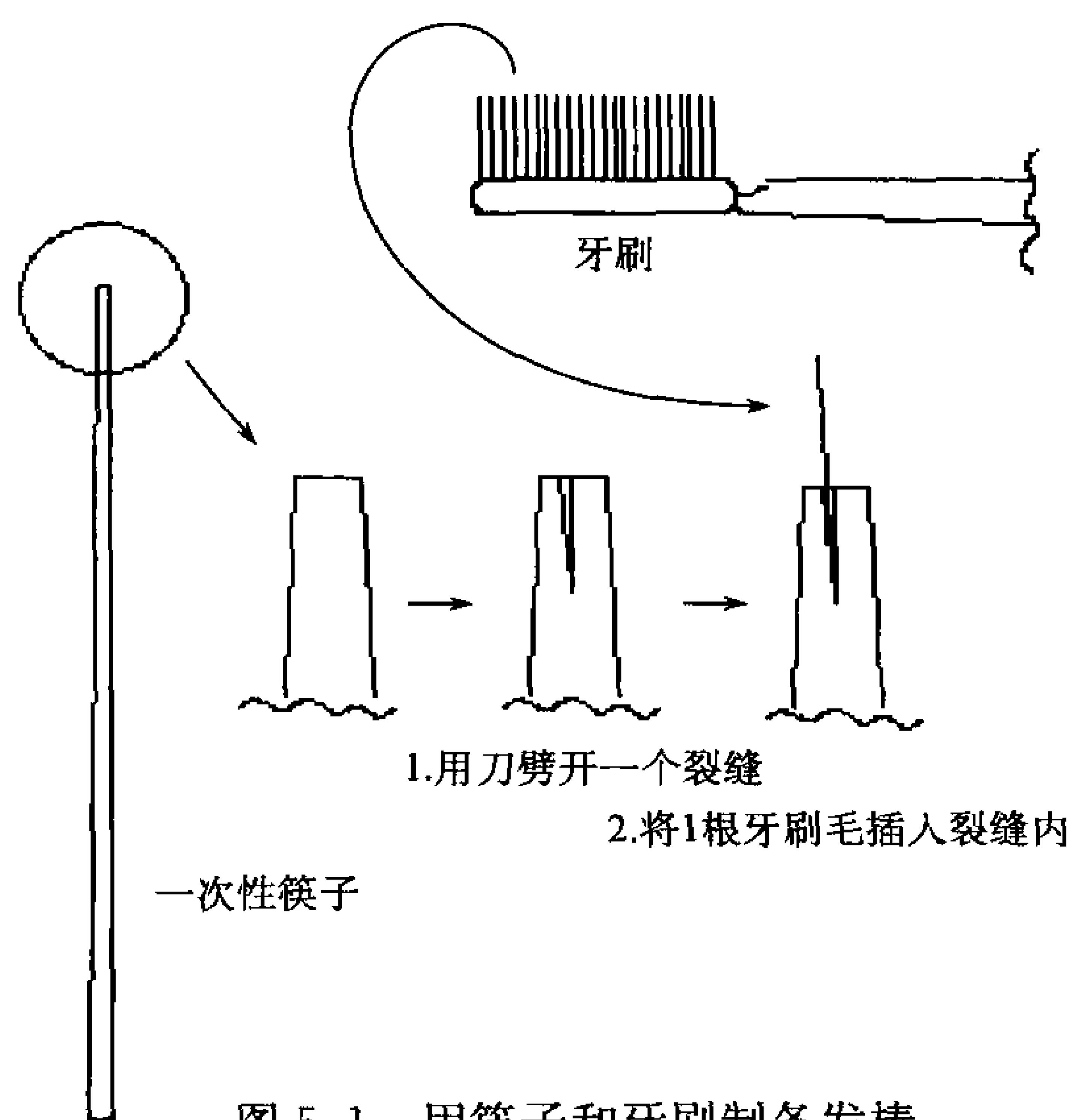


图 5.1 用筷子和牙刷制备发棒

是用来进行角膜手术的剪刀，尺寸非常小，刀刃的长度大约为 5 mm，可向当地供应商购买)；“发棒”（手工制作的组织处理工具）[见图 5.1 和注意事项（1)]。

（4）磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）（不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}）：8.00 g NaCl；1.15 g Na_2HPO_4；0.20 g KCl；0.20 g KH_2PO_4。溶于水中，定容至终量 1000 ml。

（5）Dulbecco 培养基（DMEM；Nissui 制药公司，Tokyo，05919）加 1%胎牛血清（FBS)。根据厂商说明制备 DMEM，并按 99∶1（V/V）的比例与 FBS 混合。

（6）塑料培养皿（100 mm、35 mm，Corning 或其他公司的同等产品）。

2.2 培养

（1）培养基：DMEM 加入 10%FBS 和 50 μg/ml 卡那霉素 [见注意事项（2)]。

（2）Nuclepore™聚碳酸酯滤膜（孔径为 8 μm；Structure Probe 公司，F8013-MB)。

（3）胶原 [IC 型，3.0 mg/ml，pH3.0；Nitta Gelatin 公司，Osaka，Japan；见注意事项（3)]。

（4）塑料培养皿（35 mm、60 mm)。

（5）CO_2 孵箱（5% CO_2，37℃)。

2.3 其他所需的材料

（1）4%多聚甲醛的 PBS 溶液：80 g 多聚甲醛和 100 ml 水混合。加热至 65℃，并加入几滴 1 mol/L NaOH 溶液使之溶解。冷却并加入等体积的 2×PBS 溶液。

（2）乙醇（75%、95%、100%)。

（3）二甲苯。

（4）石蜡（Histprep568，Wako 公司，Osaka，Japan，货品号码 415-25791)。

（5）制作组织切片所需的工具，如显微组织切片机和刀片、载玻片、组织切片涂布器。

（6）苏木精和伊红溶液。苏木精溶液可从 Merck 公司获得（Darmstadt 公司，Germany；货品号码 1.09249.0500)。伊红溶液：1 g 伊红 Y（Merck 公司；货品号码 1.15935.0025）溶于 100 ml 水，并加入 200 μl 乙酸。

（7）含 10 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）的 PBS 溶液：0.372 g EDTA-Na_2·2 H_2O（相对分子质量 372.24)；100 ml PBS。用 1 mol/L NaOH 调整 pH 约 8.0，使之溶解。

（8）带有振荡板的 37℃孵育箱（Eyela 公司，Tokyo，MHS-2000)。

（9）细胞增殖试剂盒（Amersham Biosciences 公司，RPN20)。

（10）腺病毒载体构建物（如携带有 CAG 启动子的 lacZ 腺病毒载体)[7]。

3 方法

3.1 小鼠胚胎皮的器官培养

3.1.1 用胶原包被滤膜

（1）事先对 Nuclepore™滤膜进行高压灭菌。

（2）在无菌环境中将多片滤膜放入塑料培养皿中，有光泽的一面向上，滤膜间不要重叠。

（3）使用胶原溶液（3.0 mg/ml）覆盖滤膜，并迅速将胶原溶液吸去。

（4）使其自然干燥至滤膜上无残留液体。

（5）制备好的滤膜在室温中可保存数天。

3.1.2 从怀孕小鼠体内取出胚胎

（1）在乙醚麻醉下采用颈椎脱臼法处死孕期 12.5 d 或 13.5 d 的小鼠。

（2）切开腹部，用镊子固定子宫，并将其切下。提起子宫，切断联结的系膜组织，并将其转移至装有 PBS 溶液的培养皿中。

（3）切开子宫的肌肉层并取下胚胎，注意要保持绒膜羊膜完整。

（4）在立体显微镜下切开绒膜羊膜，切断脐带，并将胚胎转移至含 1%FBS 的 DMEM 溶液中，DMEM 溶液置于冰上。不要用镊子夹捏胚胎，而是要轻轻将其挖出，从而避免对组织造成破坏［见注意事项（4）］。

3.1.3 在立体显微镜下切下皮肤组织

（1）将胚胎转移至 35 mm 的培养皿，其中加入含 1%FBS 的 DMEM 溶液（培养基的量以刚刚将胚胎覆盖为宜，使组织不能自由移动）。

（2）用小剪刀沿图 5.2 中设计的切割线切下背侧皮肤。

（3）用小剪刀的刀刃轻轻将皮肤从肌肉层上刮下。不要破坏皮肤组织［见注意事项（5）］。

（4）将皮肤组织放于培养基中，置于冰上。

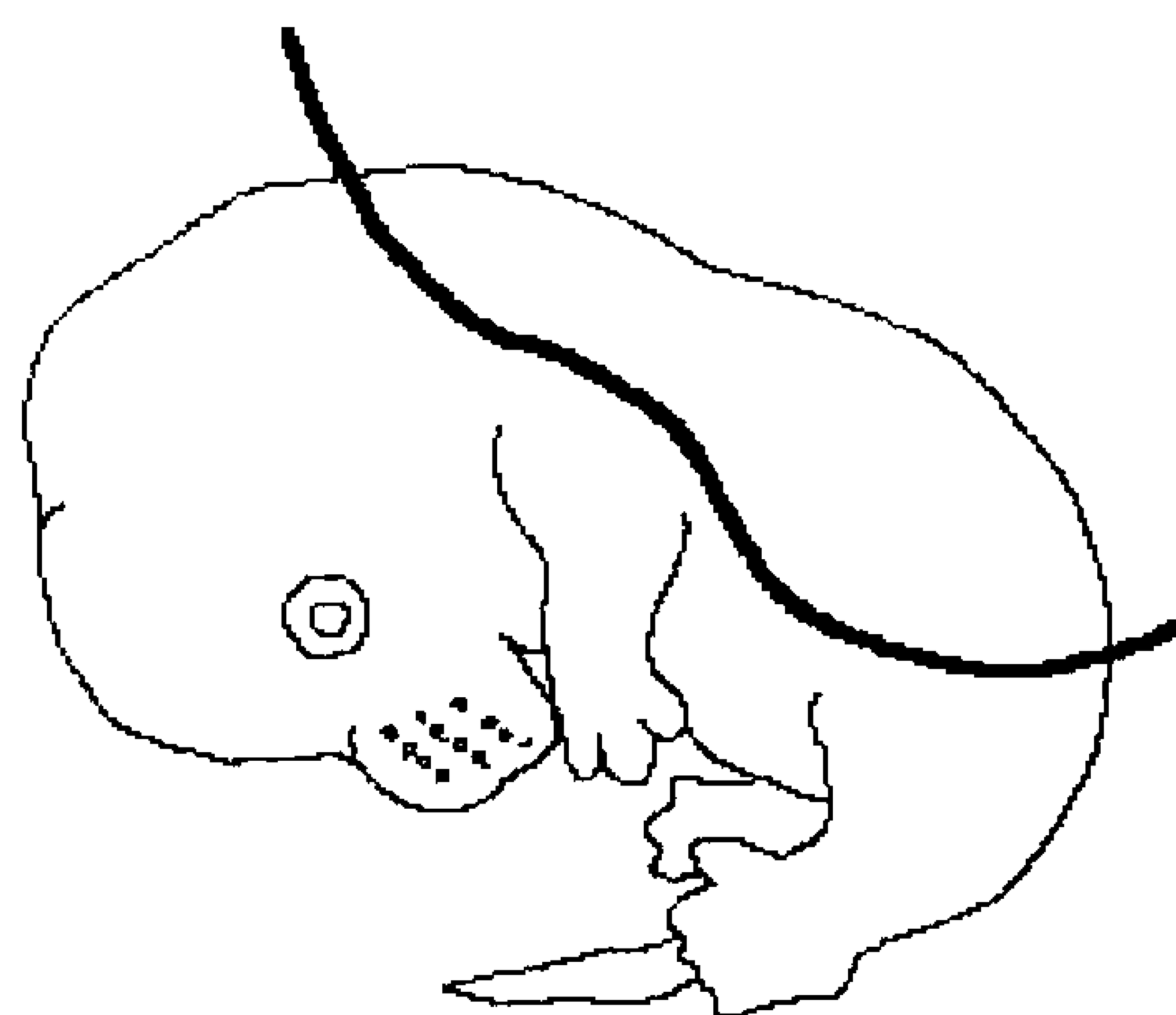


图 5.2 胎鼠背上设计的切割线

3.1.4 将皮片展开培养

（1）用少量含 10%FBS 的 DMEM 溶液（约 100 μl）将皮片转移至已包被胶原的滤膜上。

（2）皮片的真皮面向上（图 5.3），用发棒将其铺展开。

（3）将皮片的表皮面翻转向上，用发棒将其铺展开。

（4）在铺开的过程中，将培养基一点一点吸出来以便铺展，避免皮片变干。最后，仅保留少量培养基将皮片覆盖。

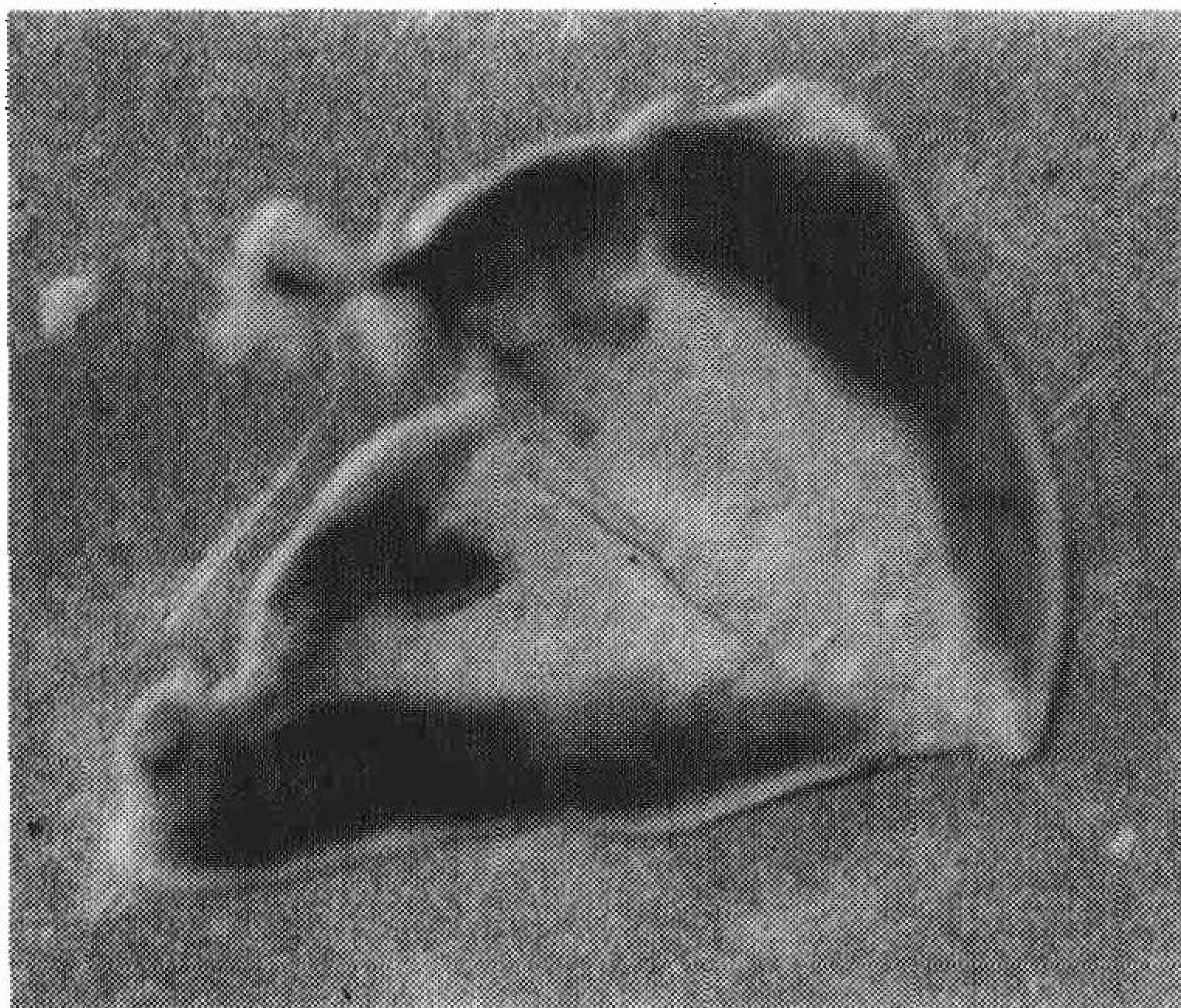


图 5.3 铺开前真皮面向上的皮片组织，取自于孕期 13.5 d 的小鼠胚胎

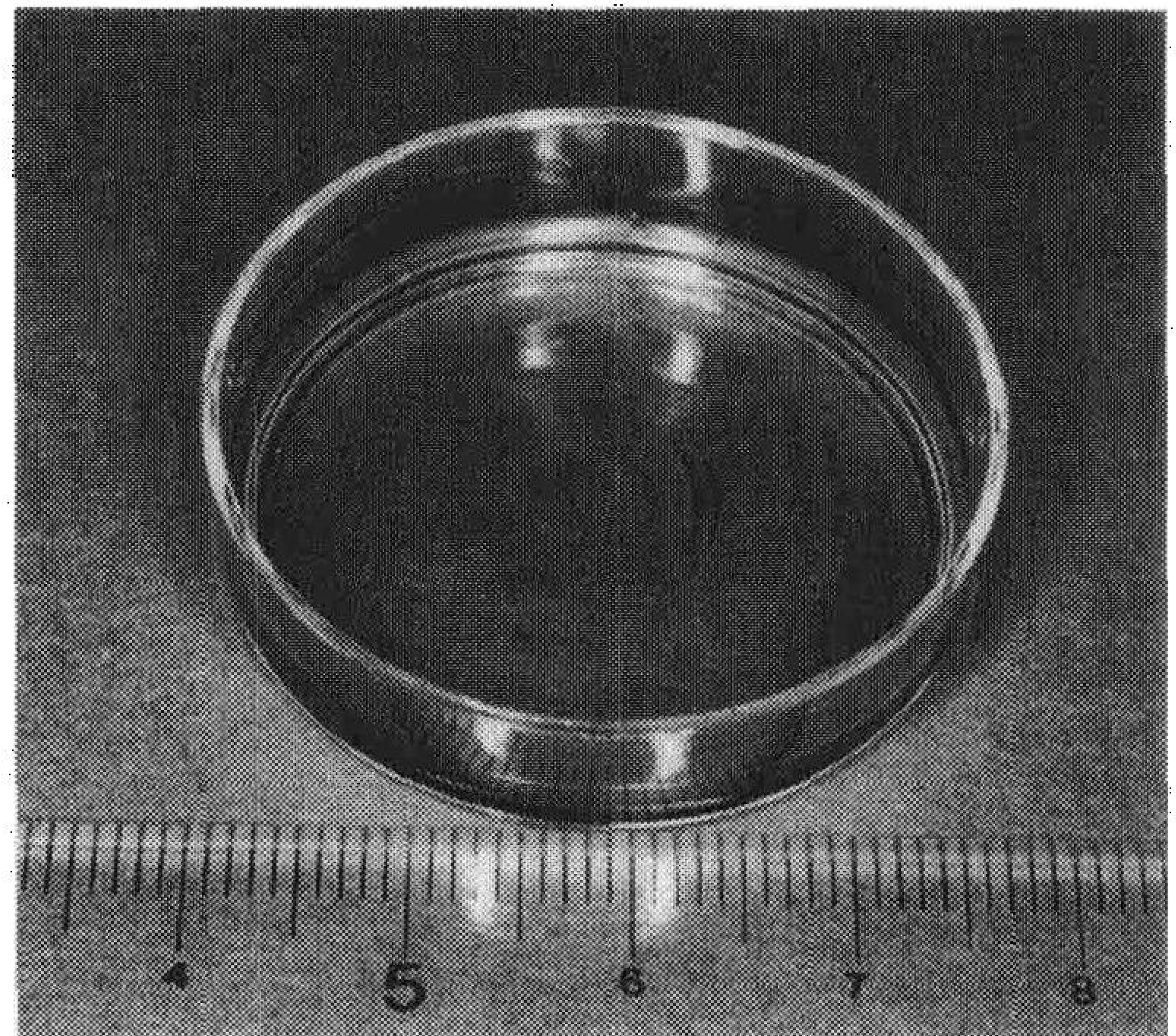


图 5.4 在漂浮滤膜上小鼠胚胎皮肤的器官培养

(5) 将滤膜转移至一个 35 mm 的培养皿，其中加有 2 ml 含 10%FBS 的 DMEM 溶液（图 5.4）。

(6) 将培养皿孵育培养，使滤膜漂浮于培养基上以促进气体交换和培养基交换［见注意事项 (6)］。

3.2 培养皮片组织的形态学分析

3.2.1 组织切片的制备及苏木精和伊红染色

(1) 用 PBS 溶液清洗培养于滤膜上的皮肤组织一次。

(2) 在 4℃下，用含 4%多聚甲醛的 PBS 溶液固定组织 2 h。连同滤膜一起将皮片切成 2 片。

(3) 对组织按以下步骤进行脱水。

a. 梯度乙醇脱水（70%、80%、90%、95%、100%乙醇，每一浓度浸泡两次，每次浸泡时间大于 1 h)。

b. 将组织浸泡在 100%乙醇中过夜。

c. 将组织浸泡入二甲苯中两次，时间大于 2 h。

d. 将组织浸泡在二甲苯中过夜。

e. 将组织浸泡入石蜡中两次，时间大于 2 h。

f. 将组织浸泡在石蜡中过夜。

(4) 按垂直位用石蜡包埋组织。

(5) 将组织块切成 4 μm 厚的组织切片。

(6) 按以下步骤脱蜡：①将切片先后浸入两个容器的二甲苯中，每次 3～5 min；②将切片先后浸入两个容器的 100%乙醇中，每次 3～5 min；③将切片浸入 75%乙醇 3～5 min。

(7) 对组织切片进行常规苏木精和伊红染色。

a. 用自来水冲洗切片 2～4 min。

b. 将切片浸入 Mayer 氏苏木精溶液 3～5 min。

c. 用自来水冲洗 10～20 min。

d. 将切片浸入伊红溶液 2～4 min。

e. 用自来水冲洗数秒钟。

f. 将切片依次浸入 75％、95％、100％乙醇两次、二甲苯两次，进行脱水。

g. 用 Entellan（Merck 公司；货号 940389088）对组织切片封片。

3.2.2 分离表皮和真皮

(1) 将皮片在含 10 mmol/L EDTA 的 PBS 溶液中于 37℃下孵育 10～30 min，并轻微摇动［见注意事项（7）］。

(2) 在立体显微镜下，用发棒将表皮与真皮分离。

(3) 将表皮铺开后观察或经处理后进行生化分析。

3.3 其他技术

3.3.1 细胞生长监测［见注意事项（8）］

(1) 按 3.1 的介绍培养小鼠胚胎皮肤。

(2) 在收获组织前 1 h，用含 10 nmol/L 5-溴-2′-脱氧尿核苷（BrdU）和 1 nmol/L 5-氟-2′-脱氧尿核苷的培养基替换先前使用的培养基。

(3) 按 3.2.1 介绍的方法进行皮肤组织处理。

(4) 用细胞增殖试剂盒（Amersham 公司）检测 DNA 中的 BrdU 掺入量。

3.3.2 表皮生长因子（EGF）对毛芽形成的特异性抑制［见注意事项（9）］

(1) 按 3.1 的介绍制备和铺开小鼠胚胎皮肤组织。

(2) 用含 30 ng/ml EGF 的培养基替换先前使用的培养基，覆盖皮肤组织。

(3) 把皮片连同滤膜放在含 30 ng/ml EGF 的培养基中。

(4) 按 3.2.1 介绍的方法制作好组织切片后进行形态学观察，或按 3.2.2 介绍的方法分离表皮后进行观察[6]。

3.3.3 用腺病毒载体将基因转导入皮肤组织[8]

(1) 根据 Kanegae 等介绍的方法[9]制备含目的 cDNA 片段的腺病毒载体，部分纯化并测定其滴度。

(2) 将新分离的皮肤组织孵育并铺开在滤膜上，使其悬浮在 1 ml 含 8×10^8 个噬菌斑形成单位（pfu）腺病毒载体的培养基中。每小时更换一次培养基，用大体积培养基覆盖皮肤组织（如果培养基含腺病毒载体较少，感染效率会明显较低。）。

(3) 在孵育开始 6 h 后，将皮片转移到新鲜培养基中［孵育 1～3 h 或 12～24 h 会分别导致感染效率较低或产生毒性作用；见注意事项（10）］。

4 注意事项

（1）发棒：各种刷毛硬度的牙刷都可以在商店中买到。我们建议制备好带有不同硬度刷毛的发棒，较柔软刷毛制成的发棒适合处理细小的组织。发棒非常有助于处理任何脆弱的组织而不造成组织损伤。

（2）在处理小鼠胚胎和皮肤组织时，重要的是不能用镊子夹捏，而要轻轻地挖取它以免损伤组织。对皮肤组织的损伤将减缓伤口周围组织的生长发育。

（3）从肌肉层剥离皮肤组织的难度取决于疏松皮下组织的发育程度。早于孕期 12.5 d 时剥离比较难，但迟于 12.5 d 就变得比较容易。

（4）胶原溶液中的 IC 型胶原（Nitta gelatin）是由猪皮制备而来的，它的黏度低，适用于滤膜包被。其他任何类似的产品也可用来包被滤膜。

（5）我们常用含 10%FBS 的 DMEM，但实际操作中 FBS 浓度低至 1%也没有明显影响。

（6）采用上述方法培养的胎鼠皮，在 3～4 d 的培养时间里，皮肤组织可经历与体内相类似的发育过程。培养时间过长则导致组织逐渐分解。

（7）培养过程中，只在表皮基底层和毛芽部位可见生长中的细胞。

（8）用含 30 ng/ml EGF 的培养基孵育可完全抑制毛芽的形成，然而表皮的发育仅受到些微小的影响[6]。

（9）使用 EDTA 从真皮分离表皮所需的时间取决于组织的来源情况。培养的组织或取自较幼小胚胎的组织易于分离；然而，取自孕期 16.5 d 或 17.5 d 的胚胎组织则需要较长的时间。

（10）在现有条件下用腺病毒载体进行基因转导的效率实际上可达 100%，但当表皮分层和角化后，转导效率迅速降低。

（刘佳琦 译　胡大海 校）

参考文献

[1] Schuger, L., Varani, J., Mitra, R., and Gilbride, K. (1993) Retinoic acid stimulates mouse lung development by a mechanism involving epithelial-mesenchymal interaction and regulation of epidermal growth factor receptors. *Dev. Biol.* **159**, 462—473.

[2] Chai, Y., Mah, A., Crohin, C., Groff, S., Bringas, P., Le, T., et al. (1994) Specific transforming growth factor-beta subtypes regulate embryonic mouse Meckel's cartilage and tooth development. *Dev. Biol.* **162**, 85—103.

[3] Weller, A., Sorokin, L., Illgen, E. M., and Ekblom, P. (1991) Development and growth of mouse embryonic kidney in organ culture and modulation of development by soluble growth factor. *Dev. Biol.* **144**, 248—261.

[4] Coleman, S. and Daniel, C. W. (1990) Inhibition of mouse mammary ductal morphogenesis and down-regulation of the EGF receptor by epidermal growth factor. *Dev. Biol.* **137**, 425—433.

[5] Sengel, P. (1976) Morphogenesis of skin. Cambridge University Press, Cambridge.

[6] Kashiwagi, M., Kuroki, T., and Huh, N. (1997) Specific inhibition of hair follicle formation by epidermal growth factor in an organ culture of developing mouse skin. *Dev. Biol.* **189**, 22—32.

[7] Kanegae, Y. , Lee, G. , Sato, Y. , Tanaka, M. , Nakai, M. , Sakaki, T. , et al. (1995) Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucl. Acid Res.* **23**, 3816—3821.

[8] Kuroki, T. , Kashiwagi, M. , Ishino, K. , Huh, N. , and Ohba, M. (1999) Adnovirus-mediated gene transfer to keratinocytes-review. *J. Invest. Dermatol. Proc.* **4**, 153—157.

[9] Kanegae, Y. , Makimura, M. , and Saito, I. (1994) A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn. J. Med. Sci. Bol.* **47**, 157—166.

第6章　分析培养的角质形成细胞体外和体内分化功能的实验模型

Nicole Maas-Szabowski, Norbert E. Fusenig, Hans-Jürgen Stark

摘　要：本章中我们将详细讲述体外构建皮肤替代物的相关技术，即以胶原凝胶混合成纤维细胞，在其上覆盖增殖和分化的角质形成细胞构成皮肤。这类皮肤替代物可清晰地显示出表皮与间充质的相互作用。现已证明它们是具有广泛应用价值的实验研究工具，例如，可用于研究角质形成细胞分化和增殖的旁分泌调节机制。此外，该项技术还可以用于体内研究，尤其是涉及上皮细胞的恶性生长潜能、肿瘤发生中受到干扰的分化调控，以及对血管发生的影响等特性的研究。因此，我们还分别介绍了人角质形成细胞和皮肤替代物异种移植到无胸腺小鼠背部肌筋膜上的技术。

关键词：器官型共培养（organotypic cocultures）；皮肤替代物；角质形成细胞分化；表皮-间质相互作用；表面移植分析；致瘤试验

1　导言

结构有序和组织良好的鳞状上皮（如皮肤表皮）的发育严格地依赖于表皮细胞与结缔组织的相互作用。成熟的表皮组织包含基底层、棘层、颗粒层和角质层，它的发育是涉及角质形成细胞增生和终末分化的连续过程，间充质细胞在表皮的形成和维持中起到重要的调控作用[1]。细胞培养是研究细胞生物学调节因素和调控机制的简易实验方法，然而，由于细胞培养只能简单模拟体内环境，大多数类型的细胞（包括角质形成细胞），在体外只能表现出部分的固有分化潜能。例如，单层培养的角质形成细胞永远达不到在体内的终末分化状态，即便与成纤维细胞共培养后亦是如此。

虽然如此，离体培养的上皮细胞在与间充质细胞共培养时，会对适当的细胞外调控刺激产生反应，表现出组织特异性分化的内在潜能[2~4]。因此，体外模型系统是研究表皮-间充质相互作用和鉴定调节因子的适宜工具。

Rheinwald 和 Green[5]首先建立了扩增原代角质形成细胞的培养方法——饲养层共培养法，目前这种方法仍作为常规方法加以应用。角质形成细胞与有丝分裂后的成纤维细胞（饲养细胞）在培养基浸没条件下共培养，可以形成高度增殖的单层表皮细胞，然而却没有正常的分层和分化。

与此相反，需要通过体外三维培养体系或体内移植的方法才能使角质形成细胞发育为分层良好的上皮组织，从而对上皮细胞的分化过程及其调控进行研究。这种培养体系即器官型共培养，可以由正常的上皮细胞和间充质细胞组成，也可以是正常细胞与新生瘤转化上皮细胞（即永生化细胞系）二者的组合，甚至是来自不同种属（人/小鼠）的

细胞组合。利用器官型共培养的方法，可以更好地扩展局部与全身作用因子影响的研究选项，明确转化细胞异常的生长与分化特点，了解癌细胞的恶性行为特征如正常组织结构丧失、肿瘤形成和侵袭。实际上，目前已经应用器官型共培养模型对依赖角质形成细胞分化的很多表皮生物学特性进行了研究，例如，创面愈合时的重新上皮化、人乳头瘤病毒的调控作用，以及皮肤角质层屏障的形成[6~8]。

尽管受到越来越多的法律约束和公众反对，利用活体生物进行研究仍然不能完全放弃，如癌症等方面的研究工作。虽然可以利用体外模型研究表皮-间充质的相互作用，但是始终需要在更符合生理状况的环境中，也就是体内条件下来证实体外观察结果的生物学意义及在体内的相关性。除了用基因敲除小鼠或转基因小鼠来检测基因的功能外[9]，体表移植分析是研究正常上皮生理学[10,11]和恶变细胞异常生长与分化的最可靠的实验方法[9,12]。

2 材料

2.1 器官型培养（organotypic cultures）的准备

2.1.1 胶原制备

（1）I型胶原，可从大鼠鼠尾肌腱分离［见注意事项（1）］，也可以选择以下几种产品。

（2）Vitrogen-100，牛真皮 I 型胶原（Collagen Corp.，Palo Alto，CA；cat. no. FXP-019）[13,14]。

（3）I型胶原，大鼠鼠尾肌腱（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. C-7661）。

（4）I型胶原，小牛皮肤（IBFB Pharma GmbH，Leipzig，Germany；cat. designation ‘collagen typeI’）[15]。

2.1.2 带滤膜细胞培养嵌入小室和器官型培养的实验器材

（1）Falcon 细胞培养嵌入小室：孔径 1.0 μm（BD Biosciences，Bedford；MA cat. no. 3102）或孔径 3.0 μm（cat. no. 3091）。

（2）BioCoat 六深孔培养板（BD Biosciences；cat. no. 5467）。备选的带滤膜细胞培养嵌入小室，列举在下述（3）～（5）中。

（3）带有纤维素酯膜的 Millicell 嵌入小室（直径 30 mm，孔径 0.4 μm；Millipore，Billerica，MA；cat. no. PICM 030 50）[13]。

（4）带有聚碳酸酯膜的 6 孔板 Transwell 可渗透嵌入小室（孔径 0.4 μm；cat. no. 3412，或 3.0 μm，cat. no. 3414，Corning-Costar，Acton，MA）。

（5）带有 3 μm 孔径聚碳酸酯膜的 Nunc 细胞培养嵌入小室，直径 25 mm（Nalge Nunc International，Rochester，NY；cat. no. 137435）。

（6）玻璃环，外径 20 mm，内径 18 mm，高 12 mm。

（7）精细弯镊子（Dumont type，no. 5）。

2.1.3 溶液和培养基

（1）10×Hank 盐溶液，添加 8 mg/ml 酚红（Biochrom，Berlin，Germany；cat. no. L 2025）。

（2）胎牛血清（FBS），经支原体检测（Biochrom，cat. no. S 0115）。

（3）胶原凝胶混合物：20 ml 中包含 16 ml 的 4 mg/ml 胶原储备液、2 ml 含酚红的 10×Hank 盐溶液和 2 ml FBS。胶原凝胶混合物可以含或不含成纤维细胞 [见 3.1.1]。

（4）培养基（用于与正常人角质形成细胞的器官型共培养）：3∶1 的 DMEM 和 Ham F12 培养基（Biochrom；cat. nos. FG 0435 and FG 4815）混合物，添加 10% FBS，青霉素-链霉素（100 U/ml 和 100 μg/ml，Biochrom：cat. no. A 2213），0.5 mmol/L 丙酮酸钠（Biochrom；cat. no. L 0473），10^{-10} mol/L 霍乱毒素（Sigma；cat. no. C 3012），0.4 mg/ml 氢化可的松（Sigma；cat. no. H 0135），50 μg/ml 维生素 C（Sigma；cat. no. A 4034）[见注意事项（2）]。

2.2 移植术

（1）无胸腺 Swiss 裸小鼠（nu/nu），雌性，周龄不小于 5～6 周，体重 22～26 g，饲养于清洁动物房 [见注意事项（3）]。

（2）移植室：用硅酮制成，带有圆顶形的中央部和宽阔的薄边（Renner KG，Dannstadt，Germany，type F2U；cat. no. 30268）[见注意事项（4）]。

（3）Combi Ring Dish（CRD）培养室，带有一对聚四氟乙烯同心环（Renner KG，内环：type b，cat. no. 30907；外环：type c，cat. no. 30910），两环之间装载细胞外基质 [见注意事项（4）]。

（4）聚丙烯薄膜（厚 20 μm，Renner KG；cat. no. 30274 A）[见注意事项（4）]。

（5）Stanzen 培养皿：35 mm 组织培养皿，在平皿的培养面有 4 个高 1 mm、直径 8 mm 的环（Renner KG；cat. no. 30272）[见注意事项（4）]。

（6）规格为 2 号和 3/4 号的一次性无菌导管。

（7）小鼠的麻醉：盐酸氯胺酮（Ketavet，Parke-Davis，Berlin，Germany）和盐酸甲苯噻嗪（Rompun，Bayer-Vital，Leverkusen，Germany）。

（8）外科伤口缝合夹，14 mm（Diener GmbH，Tuttlingen，Germany；cat. no. 845.14）。

2.3 分析纯试剂

（1）组织学固定：将 37% 甲醛以 1∶10 稀释在磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）里，pH 7.4。

（2）冰冻样本的包埋：Tissue Tek OCT-复合物（Lab Tec. Prods.，Naperville，IL；cat. no. 4583）。

（3）溴代脱氧尿苷（BrdU）和溴代脱氧胞苷（ICN Biomedicals Inc.，Irvine，CA；cat. nos. 100171/100166）。

（4）抗-BrdU 抗体：单克隆抗体，克隆号 Bu5.1（工作浓度 1∶20，用 PBS 稀释，

Progen，Heidelberg，Germany；cat. no. 61015）和多克隆羊 BrdU 抗血清（工作浓度 1∶200，用PBS稀释，Exalpha Biologicals，Boston，MA；cat. no. A 205 P）。

（5）荧光 DNA 染色剂：DAPI（二脒基苯吲哚，工作浓度 0.5 μg/ml，Molecular Probes，Eugene，OR；cat. no. D-1306）和 Hoechst 33258（二苯甲亚胺，工作浓度 2.5 μg/ml，Molecular Probes；cat. no. H-1398）。

（6）抗 Ki-67 核抗原的单克隆抗体（克隆号 MIB-1，DAKO A/S，Glenstrup，Denmark；cat. no. M 7240）。

3 方法

3.1 表皮细胞和间充质细胞的器官型共培养

目前已经建立了适于研究表皮-间充质相互作用分子机制的、与体内相似的器官型培养模型[16,17]。将 I 型胶原（来自大鼠或牛的肌腱、皮肤或胎盘）置于特殊的带滤膜细胞培养嵌入小室中作为真皮层，人表皮角质形成细胞种植在 I 型胶原上，进行气液界面培养（图 6.1）。真皮替代物还可用 IV 型胶原、基质胶、软琼脂或胶原和葡萄糖胺聚糖混合物构建[18~21]。还可以将成纤维细胞种植到胶原凝胶里，构建有功能的真皮替代物。成纤维细胞能够在胶原里进行增殖，并分泌细胞外基质，就像在创伤愈合过程中一样重塑基质[3,4,22,23]。在这些器官型培养模型中，培养物与培养基的接触仅限于凝胶的底部，成纤维细胞和角质形成细胞通过培养基扩散从底部吸取营养。

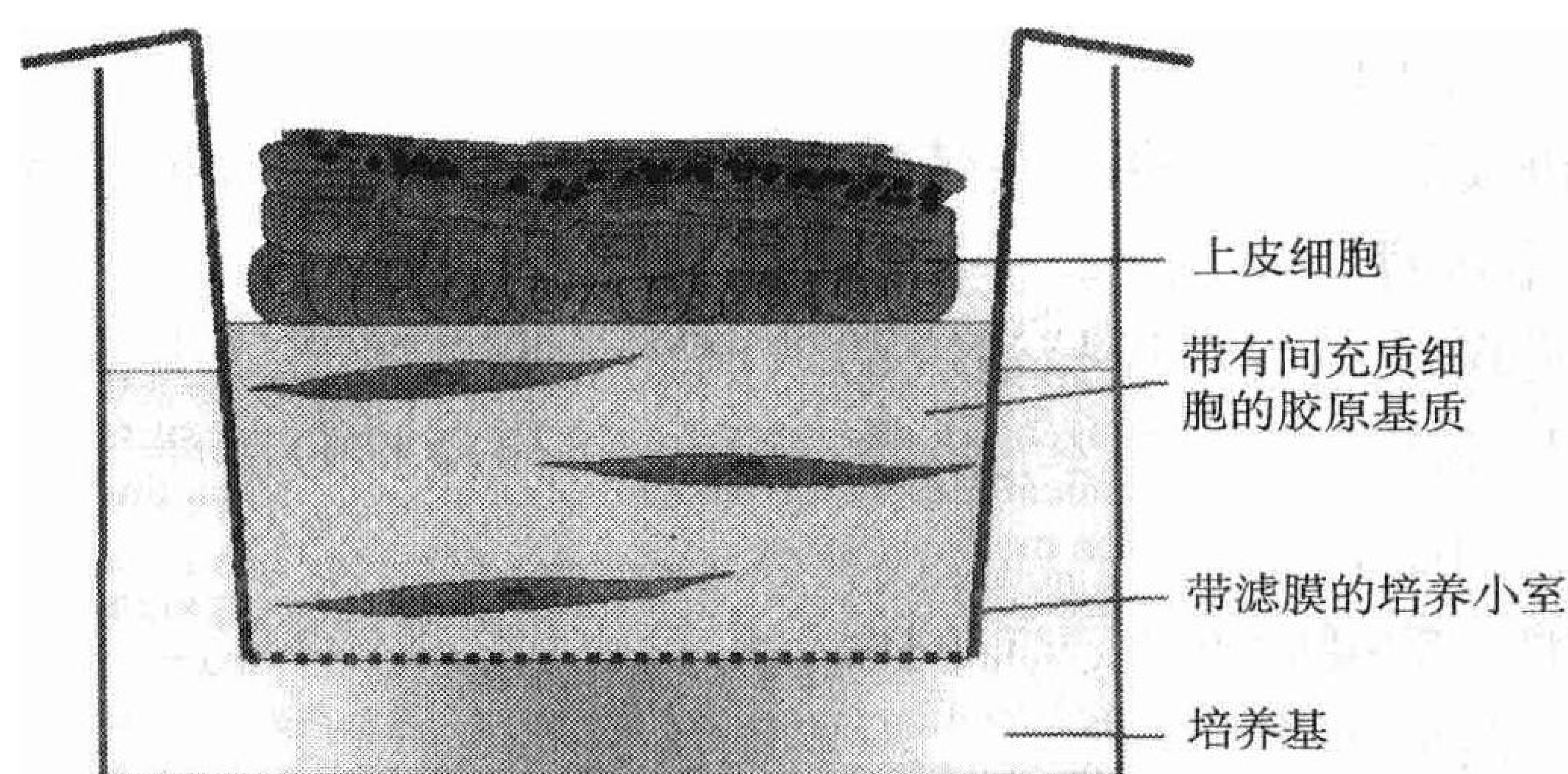


图 6.1 器官型培养体系中皮肤替代物的示意图

角质形成细胞种植于含成纤维细胞的胶原凝胶上，暴露于空气中培养，由下面的培养基提供营养。

然而，当胶原凝胶收缩成为胶原纤维定向排列的致密结构时，成纤维细胞就会像在活体真皮里一样，处于静息状态，增殖能力降低，合成分泌蛋白的功能发生变化[22]。通过提高胶原的浓度（达到约 4 mg/ml），可以阻止成纤维细胞的收缩，同时又不会减弱对表皮的支持功能。为了使器官型培养体系中的成纤维细胞层标准化，可以用高剂量的 X 射线照射成纤维细胞，从而使其一直处于有丝分裂后的状态，同时又保留功能活性，甚至能保留细胞的完整性和存活力，以及表达并分泌生长因子、细胞因子和对特定作用因素起反应的能力[3,23~27]。

当表皮细胞种植于含成纤维细胞的胶原凝胶上表面时，它们能迅速贴附并在1～2 d内形成汇合的表皮层。随后，角质形成细胞增殖，重建类似表皮的上皮组织结构，并表达表皮特有的分化标志[1,2,28]。当缺乏成纤维细胞时，角质形成细胞迅速丧失增殖能力，发生不完全的分化，只能形成薄的表皮层[1,4,23]。

这些器官型共培养模型模拟了体内间充质细胞和表皮细胞相互作用的环境，已用于证明可扩散性因子在表皮-间充质相互作用中发挥的功能，以及角质形成细胞和成纤维细胞在基底膜形成过程中的协同作用[4,29]。

3.1.1 真皮替代物的构建

(1) 制备50 ml浓度为4 mg/ml的胶原储存液：200 mg低压冻干的I型胶原重新溶解在50 ml的0.1%乙酸中，低温下搅拌，储存于4℃。

(2) 在配置胶原凝胶混合物之前，所有的组分都置于冰上预冷。8份胶原储存液与1份含有酚红的10×Hank缓冲液混合，用2 mol/L NaOH滴定到pH7.4，在冰上持续缓慢搅拌。溶液呈现橙红色时表明胶原凝胶溶液已滴定到pH7.4，通常每12 ml胶原溶液需滴加80 μl 2 mol/L的NaOH。

(3) 将胶原凝胶中所需密度（1×10^5～1×10^6个细胞/ml）的成纤维细胞数量重悬于FBS（占总量的一部分）中，再与凝胶溶液混合，在冰上小心搅拌混匀。在无细胞凝胶的情况下，只加入总体积10%的FBS。

(4) 用冷移液管吸取2.5 ml制备好的胶原凝胶混合物［最终胶原浓度为3.2 mg/ml，见2.1.3的步骤（3）］，置于Falcon带滤膜嵌入小室［6孔板用的带滤膜小室；cat. no. 3091；见2.1.2的步骤（1），图6.1］。

(5) 为了促进凝胶形成，将这些带滤膜嵌入小室置于BD-BioCoat六深孔培养板并于37℃的保湿孵箱孵育1 h［见2.1.2的步骤（2）］。

(6) 将与滤膜嵌入小室直径相适应的玻璃环［见2.1.2的步骤（6）］放置于凝胶上，用一镊子向下轻压［见2.1.2的步骤（7）］，挤压凝胶的新月面，形成一水平区域，用于种植角质形成细胞。

(7) 带有玻璃环的凝胶置于37℃的保湿孵箱1 h。

(8) 轻轻吸出凝胶上多余的液体，不要触及凝胶或玻璃环。

(9) 将凝胶完全浸没在培养基中24 h，使之与培养基平衡。

3.1.2 表皮细胞的应用

(1) 将表皮细胞，如人角质形成细胞（在2.5 cm的带滤膜嵌入小室里加入含1×10^6个细胞的培养基1 ml），接种于内环里。通常使用刚消化的第二代角质形成细胞，因为更晚代数的细胞不太适合。这些细胞于12～24 h后黏附在胶原凝胶上并形成接近融合的一层。

(2) 种植后24～30 h，角质形成细胞层用1 ml培养基小心漂洗，然后去除玻璃环，小心避免表皮细胞膜片的任何机械性损坏［见注意事项（5）］。

(3) 换液，减少培养基的用量（深孔培养板每孔10～11 ml），培养基液面只能加到胶原凝胶的底面，进行气液界面培养，限制细胞只通过培养基的扩散从底部吸收营养。

3.1.3 分析

在上述极化培养体系中，可以对一些定向过程的调控如分泌功能或分层分化机制进行研究。另外，还可以研究一些因子的局部效应（加在上皮培养物的上表面）或系统效应（加在培养基里，首先作用于凝胶里的成纤维细胞，然后再作用于基底层的表皮细胞）。

形态学分析是检测表皮组织重建的最重要的定性指标，组织经过适当的处理后在光镜或电镜下观察，用免疫组化法检测分化产物的空间表达。

进行组织学分析或免疫组化检测时，首先把器官型共培养物（organotypic cocultures）以3.7%甲醛固定，然后包埋在2%琼脂里，以防止在进一步的制备过程中表皮层和真皮层的移位，最后整体包埋在石蜡或组织 Tek-OCT-复合物中，迅速置于液氮中冷冻，以备冰冻切片用[30]。

细胞增殖及分裂指数可以通过以下方法检测：用胸腺嘧啶类似物5-BrdU来标记培养物，然后用特异性抗BrdU抗体，在石蜡或冰冻切片检测其掺入[31]［见注意事项(6)］，加入BrdU时，处于S期的细胞会出现阳性的细胞核反应。若以DNA染料如DAPI或Hoechest33258复染细胞核，我们就可以计算BrdU阳性细胞与总细胞数的关系，即BrdU阳性细胞率。另外，还可以利用细胞生长周期中胞核抗原特异性的抗体Ki-67，以免疫组化的方法检测细胞的增殖，而不需要预先标记[32]。

用精细镊子，通过简单的机械分离的方法，可以把器官型共培养物的表皮层和真皮层分开，分别对这两层进行单独的分析，不会造成组织的丢失和交叉污染。以相应的分子生物学方法可在核酸和蛋白质水平分析蛋白质的表达模式[4,23,30]。

从器官型培养物（organotypic cultures）（储存于－80℃）中收集的条件培养基，可以分别用ELISA和蛋白质印迹法分析其中的分泌性蛋白（细胞外基质成分、生长因子、蛋白酶）[4,33,34]。

通常，规则的组织结构的形成是与正常的分化产物的表达模式相并行的，所以对冰冻切片或固定组织的切片进行组织化学分析，对于显示组织中特异的分化产物及其分布是非常重要的。因此，必须获得几种针对组织特异分化蛋白、细胞表面结构、桥粒蛋白、连接蛋白或基底膜成分等的抗体[2,29]。

3.2 器官型共培养的改进

根据研究者的不同要求，可以对器官型共培养模型进行较大范围的改良。就这方面而言，不同的细胞类型，如表皮细胞和间充质细胞，可以引进和组合接种；也可以使用不同的培养基成分和培养条件；真皮替代物的基质成分也可以改变。

使用来源于不同种属的表皮细胞和间充质细胞已经进行了同源和异源的组合培养。以下是已经报道的成功进行器官型共培养的上皮细胞和细胞系：小鼠皮肤角质形成细胞[35,36]、来源于毛囊间表皮[10,30]和包皮[37]的正常人角质形成细胞、来源于毛发外根鞘[38]和毛基质[39]的毛囊角质形成细胞、鳞状上皮细胞癌的角质形成细胞[40]、结膜上皮细胞[41]、人卵巢上皮细胞[42]、黏膜角质形成细胞[43]、自发永生化角质形成细胞系HaCaT[11,44,45]及它的一些基因修饰过的变异细胞[46,47]。

器官型共培养体系开发中更加吸引人的前景在于共培养时可以在上皮组织里掺入其他类型的细胞，如黑色素细胞和郎格汉斯细胞[48,49]，以及在真皮替代物里掺入内皮

细胞[50]。

我们还可以依据不同的实验目的，在基质成分里种植不同类型的真皮细胞，如小鼠3T3成纤维细胞[37,51,52]、人真皮成纤维细胞[2,4,10,11,38,53]、硬皮病的成纤维细胞，甚至是来自鳞状细胞癌（SCC）的肿瘤来源成纤维细胞[55]。

大多数细胞培养实验都采用传统的培养基（如DMEM培养基或其他培养基配方），其中含有血清及其他添加成分（如胰岛素、表皮生长因子、霍乱毒素）。目前，由于无血清培养基的开发[2]，已可以获取成分更为明确的培养基，这对于体外构建标准化的皮肤模型及其在药物毒理学的应用都具有更进一步的重要意义。

3.3 体表上皮的移植模型

评价培养表皮细胞分化和重建表皮组织能力的最佳方法就是将它们移植到生物体。对于人角质形成细胞，较好的方法是同位移植到裸小鼠的背部肌筋膜上[1,10]。此外，这种表面移植试验还可以用来检测转化角质形成细胞的致瘤潜能和侵袭性生长行为[12,30,56]。

下面我们介绍使用圆顶形硅酮移植室的特殊的移植技术［见3.3.2］，它可以用来避免移植物的干燥，并且可将移植物与邻近的宿主表皮隔离开。总体来说，有两种方法可以将角质形成细胞置入移植室：①以单细胞悬液直接移植到宿主的背部肌筋膜上（图6.2，左）；②已成形的表皮膜片直接移植到可以分隔表皮和间充质的一个居间基质上（图6.2，右）。后者更便于控制细胞黏附和生长的条件，因此也提高了培养移植物成活的可重复性。

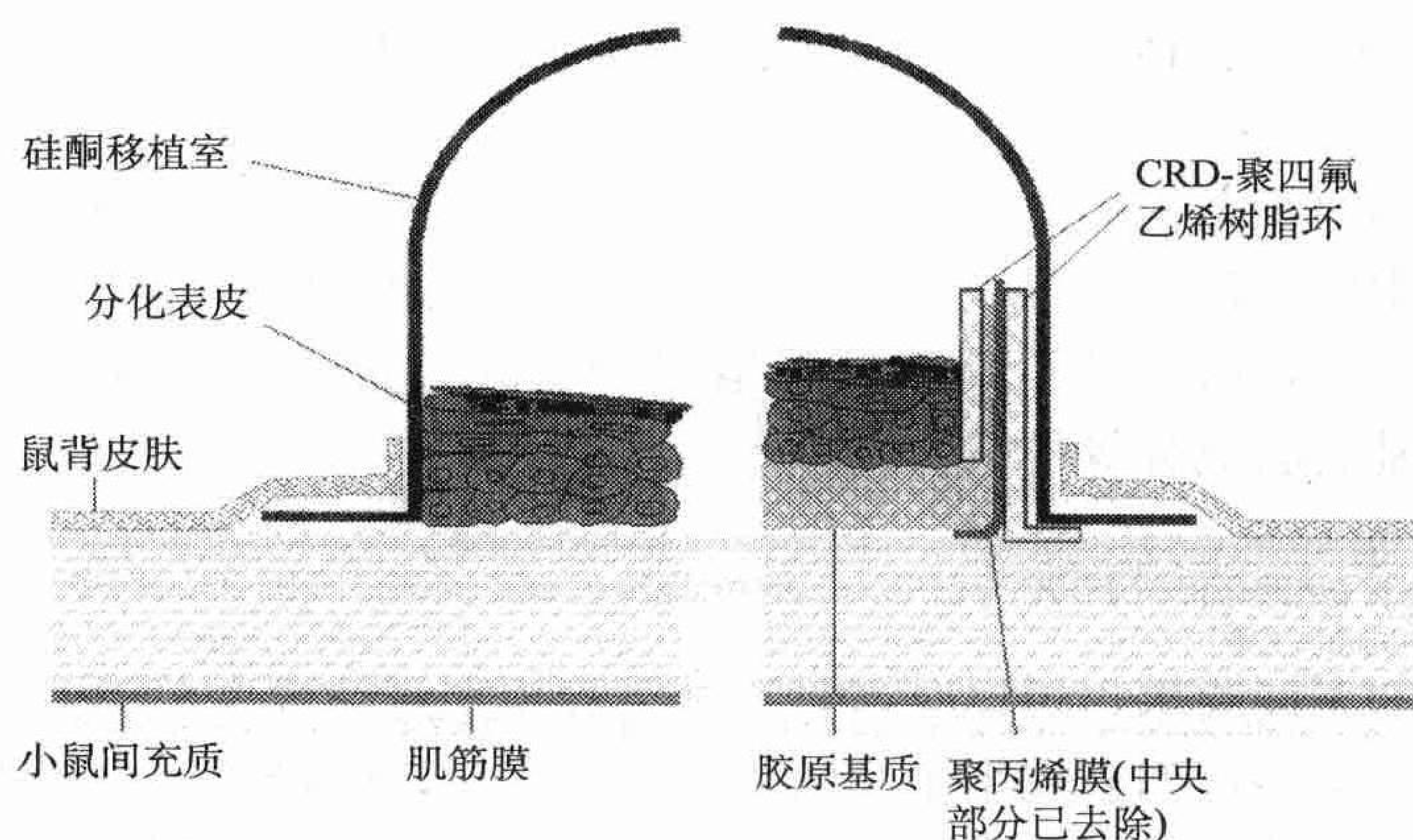


图6.2 角质形成细胞表面移植体系的横断面图

左图：角质形成细胞作为单细胞直接种植到宿主间充质上。右图：将种植于胶原凝胶（装在CRD里）的完整器官型角质形成细胞培养物植入，凝胶隔离上皮和宿主间充质，如图所示。

制备这些移植物的第一步是将角质形成细胞（通常为每片移植物 2×10^5 个）种植于I型胶原凝胶层（1～2 mm厚）上进行预培养，胶原凝胶层按上述器官型培养的方法制备，可含有或不含有成纤维细胞。两个同心聚四氟乙烯树脂环均植入胶原凝胶中，可以提高实验的稳定性，更便于实验操作。Noser和Limat[38]所描述的这种CRD系统刚

好适合于硅酮移植室。角质形成细胞种植于胶原凝胶上，浸没培养 24～48 h，然后置于硅酮移植室内，移植到裸小鼠的背部肌筋膜上［见 3.3.2］。

这种移植模型用于培养细胞的优点如下。

（1）所需细胞移植密度低［$(1\sim2)\times10^5$ 个细胞/移植物］，移植成活率高（95%～100%）。

（2）与注射细胞悬液的方法相比，制备角质形成细胞膜片的方法可以最大限度地减少细胞的损失。

（3）虽然存在组织相容性问题，但同种异体移植仍至少可以存活 4 周。显然，减少同种异体细胞的数量和可能成为免疫原的死细胞的数量，可以避免早期排斥反应的发生[10,56,57]。

（4）由于采取的保护性措施避免了宿主的角质形成细胞在移植物里的过度生长，故移植物容易辨认，可以完整剥离。

（5）由于插入了胶原凝胶，可以详尽地研究早期的间充质反应（如肉芽组织的形成、血管发生），这是很重要的优点。

（6）在这种表面移植体系中，体表的上皮可以维持稳定的典型几何形状。它与已建立的体外器官型共培养物具有相同的构型，可以用来分析表皮-间充质的相互作用并可直接进行比较。

3.3.1 细胞悬液的移植

（1）无菌条件下将硅酮移植室（不带 CRD）移植于小鼠背部肌筋膜上，将细胞直接接种在移植室内。通常将 $1\times10^5\sim2\times10^6$ 个细胞悬浮于 100 μl 培养基中，用 2 号针头直接从硅酮移植室的顶上注入，同时插入另一个针头以平衡压力（图 6.2，左）。

（2）轻轻拔出两个针头，小鼠保持在麻醉状态，小心固定约 0.5 h，使移植室处于水平位置以利于细胞黏附在肌筋膜上，防止细胞从移植室的边缘流出，否则会导致细胞分布不均匀和移植失败。

3.3.2 培养于胶原基质上的表皮细胞移植

以下步骤（1）～（7）的操作需要在无菌的层流橱内进行。

（1）按照 CRD 装置的尺寸（直径 16 mm）来制备相应大小的胶原凝胶：参照 3.1.1 制备的胶原凝胶溶液置入 24 孔培养板，每孔 500 μl，37℃保湿孵育箱内放置 1 h 以形成凝胶，然后用培养基覆盖凝胶进行平衡。

（2）从孔中取出凝胶，置于聚丙烯薄膜（3 cm×3 cm，80%乙醇消毒）上，按照聚四氟乙烯树脂内环的内径在凝胶中央打孔。聚丙烯薄膜可以避免凝胶在植入 CRD 的聚四氟乙烯树脂同心环之间时发生破裂。小心地将凝胶和聚丙烯薄膜居中置于 CRD 的外环上。

（3）把内环居中置于胶原凝胶上，与聚丙烯薄膜上的凝胶一起轻轻压入外环，凝胶就随之在 CRD 装置内环的下开口端铺展开，其边缘就夹在内外环之间。

（4）剥除掉聚丙烯薄膜的中央部分（很重要！），并用剪刀剪除聚丙烯薄膜突出于 CRD 装置上缘的伸出部分，然后将装配好的 CRD 转入添加有培养基的 Stanzen 培养皿

中，让培养基自由地从下方进入［参见 2.2 的步骤（5)］。将装入 CRD 的凝胶与培养基进行平衡，37℃孵育，建议孵育 16～24 h，以排除微生物的污染。

（5）表皮细胞（2×10^5 个细胞/100 μl 培养基）种植于 CRD 内环的凝胶上，黏附 12～24 h。

（6）漂洗 CRD 装置中的细胞，吸除培养基，然后将硅酮移植室紧紧罩在 CRD 的外环上。为了避免移植室内压力过大造成胶原基质的损坏和机械变形，可用镊子轻轻从其顶端向下插入一根插管。

（7）腹腔注射氯胺酮（0.1 mg/g 体重）和甲苯噻嗪（0.015 mg/g 体重）麻醉裸小鼠后，做背部切口。把组装好的整个 CRD 移植室转移到肌筋膜上，创缘皮肤在硅酮移植室的边缘上闭合创口并以缝合夹紧密固定，来保持 CRD 移植室位置恒定。

（8）在设定的时间点，可整体切取移植物，进一步处理以用于组织学切片和冰冻切片，或是标记 BrdU［见注意事项（6)］。

这两种方法都适合于用显示高度分化特性的移植细胞快速重建表皮组织[35,58]。而且，这种移植分析的方法是鉴别表皮细胞良性（非侵袭性）和恶性表型的可靠方法。因此，在癌症研究中，移植法是用以评估在生理环境下细胞调控异常的必不可少的工具，迄今尚不能被体外模型所取代[56]。

4 注意事项

（1）肌腱中高度富集 I 型胶原，从大鼠鼠尾可容易地获取肌腱，因此，可以从这一便利的来源用 0.1%乙酸在 4℃下分离天然 I 型胶原。离心澄清后，得到的胶原溶液可在 4℃稳定保存 6 个月，若冷冻或低压冻干后可保存数年。由于胶原的高度同源性，胶原的种属来源对细胞培养的影响并不大，而重要的是提取胶原所用酸的种类与浓度，0.1%的乙酸最为理想。胶原的最佳储存浓度是 4 mg/ml；超过 6 mg/ml，胶原会非常黏稠并难于处理。

（2）由于 L-维生素 C 在生理 pH 下不稳定，所以必须即加即用。

（3）为避免人体细胞异种移植到小鼠的移植物排斥反应，必须使用细胞免疫缺陷的动物，如无胸腺的裸小鼠。

（4）此章节提到的表面移植的装置包括硅酮移植室、Stanzen 培养皿、CRD 组件、聚丙烯薄膜和用来进行圆形打孔的打孔器，其专有供应商是：Renner KG，Riedstr. 6，D-67125 Dannstadt，Germany（http：//www. renner-laborbedarf. de)。

（5）种植在胶原凝胶上的角质形成细胞膜片，其边缘偶尔会粘在玻璃环上，必须用精细镊子分离后再取下。

（6）核苷酸的类似物 BrdU 是鉴定细胞复制的极佳工具。然而，像脱氧胸苷一样，BrdU 是核糖核苷酸还原酶的负效应因子，这样就导致了细胞内脱氧胞苷的耗竭，阻断 DNA 的合成[59]。但只要提供等摩尔数的脱氧胞苷，就可以预防前述现象。而且，5-溴代脱氧胞苷（BrdC）会提高实验的敏感性，因为它可以促进 5-溴代脱氧核苷酸掺入到 DNA 中。将各 500 mg 的 BrdU 和 BrdC 避光溶解在 37℃ 25 ml 的 0.9%NaCl 中，制备 1000×的 BrdU 或 BrdC 储备液（浓度都是 65 mmol/L)，可分装储存于－80℃。培养的

细胞可在每毫升培养基中加入 1 μl 的 BrdU/BrdC 储备液并孵育 4～16 h 进行标记。处死前 2 h，给接受细胞移植的小鼠静脉注射 0.1 ml BrdU/BrdC 储备液以标记移植的细胞。用免疫组化的方法检测掺入的 BrdU/BrdC，需要将细胞培养物或组织冰冻切片以 80%甲醇 4℃固定 5 min，然后用－20℃的纯丙酮固定 2 min，最后置入 2 mol/L 的盐酸，20℃下作用 8 min 使 DNA 变性。用 pH7.4 的 PBS 充分冲洗后（3 次），加入抗 BrdU 抗体的稀释液。免疫荧光检测为使用简便易行的 DAPI 及 Hoechst33258 复染细胞核 DNA 提供了机会，因此，这些染料可与二抗一起孵育，它们的使用浓度参见 2.3 的步骤（5）①。

（胡葵葵 译　周广东　曹谊林 校）

参考文献

[1] Fusenig, N. E. (1994) Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro, in *The Keratinocyte Handbook* (Leigh, I., Lane, B., and Watt, F., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 71—94.

[2] Stark, H. J., Baur, M., Breitkreutz, D., Mirancea, N., and Fusenig, N. E. (1999) Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 681—691.

[3] Maas-Szabowski, N. and Fusenig, N. E. (1996) Interleukin 1 induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 849—855.

[4] Maas-Szabowski, N., Stark, H. J., and Fusenig, N. E. (2000) Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced KGF expression in resting fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 1075—1084.

[5] Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331—344.

[6] Garlick, J. A. and Taichman, L. B. (1994) Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab. Invest.* **70 (6)**, 916—924.

[7] Nuss Parker, J., Zhao, W., Askins, K. J., Broker, T. R., and Chow, L. T. (1997) Mutational analyses of differentiation-dependent human papillomavirus type 18 enhance elements in epithelial raft cultures of neonatal foreskin keratinocytes. *Cell Growth Differ.* **8**, 751—762.

[8] Ponec, M., Gibbs, S., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mulder, A., and Mommaas, A. M. (1997) Epithelial growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 317—326.

[9] Bajou, K., Noel, A., Gerard, R. D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., et al. (1998) Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat. Med.* **4 (8)**, 923—928.

[10] Fusenig, N. E., Breitkreutz, D., Dzarlieva, R. I., Boukamp, P., Bohnert, A., and Tilgen, W. (1983) Growth and differentiation of transformed keratinocytes from mouse and human skin in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 168—175.

[11] Breitkreutz, D., Schoop, V. M., Mirancea, N., Baur, M., Stark, H. J., and Fusenig, N. E. (1998) Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur. J. Cell Biol.* **75**, 273—286.

---

① 原文此处为 2.3.5。——译者注

[12] Skobe, M. , Rockwell, P. , Goldstein, N. , Vosseler, S. , and Fusenig, N. E. (1997) Haltingangiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat. Med.* **3**, 1222—1227.

[13] Madison, K. C. , Swartzendruber, C. D. , Wertz, P. W. , and Downing, D. T. (1998) Lamellar granule extrusion and stratum corneum intercellular lamellae in murine keratinocyte cultures. *J. Invest. Dermatol.* **90**, 110—116.

[14] Grinnell, F. , Toda, K. I. , and Lamke-Seymour, C. (1987) Reconstitution of human epidermis in vitro is accompanied by transient activation. *Exp. Cell Res.* **172**, 439—449.

[15] Herzhoff, K. , Sollberg, S. , Huerkamp, C. , Krieg, T. , and Eckes, B. (1999) Fibroblast expression of collagen integrin receptors alpha1beta1 and alpha2beta1 is not changed in systemic scleroderma. *Br. J. Dermatol.* **141**, 218—223.

[16] Bell, E. , Ehrlich, H. P. , Buttle, D. J. , and Nakatsuji, T. (1981) Living tissue formed in vivo and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* **211**, 1052—1054.

[17] Mackenzie, I. C. and Fusenig, N. E. (1983) Regeneration of organized epithelial structure. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 189—194.

[18] Dawson, R. A. , Goberdhan, N. J. , Freedlander, E. , and MacNeil, S. (1996) Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound model. *Burns* **22**, 93—100.

[19] Supp, D. M. , Supp, A. P. , Bell, S. M. , and Boyce, S. T. (2000) Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor 1. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 5—13.

[20] Takahashi, Y. and Nogawa, H. (1991) Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane-like substratum separated from mesenchyme by the membrane filter. *Development* **111**, 327—335.

[21] Zheng, J. and Vaheri, A. (1995) Human skin fibroblasts induce anchorage-independent growth of HPV-16-DNA-immortalized cervical epithelial cells. *Int. J. Cancer* **61**, 658—665.

[22] Coulomb, B. , Dubertret, L. , Merrill, C. , Touraine, R. , and Bell, E. (1984) The collagen lattice: A model for studying epidermalization in vitro. *Br. J. Dermatol.* **114**, 91—101.

[23] Smola, H. , Thiekötter, G. , and Fusenig, N. E. (1993) Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J. Cell Biol.* **122**, 417—429.

[24] Limat, A. , Hunziker, T. , Boillat, C. , Bayreuther, K. , and Noser, F. (1989) Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 758—762.

[25] Waelti, E. R. , Inaebnit, S. P. , Rast, H. P. , Hunziker, T. , Limat, A. , Braathen, L. , and Wiesmann, U. (1992) Coculture of human keratinocytes on post-mitotic human dermalfibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 805—808.

[26] Smola, H. , Thiekötter, G. , Baur, M. , Stark, H. J. , Breitkreutz, D. , and Fusenig, N. E. (1994) Organotypic and epidermal-dermal co-cultures of normal human keratinocytes and dermalcells: regulation of transforming growth factor α, β1 and β2, mRNA levels. *Toxicol. In Vitro* **8**, 641—650.

[27] Bumann, J. , Santo-Holtje, L. , Loffler, H. , Bamberg, M. , and Rodemann, H. P. (1995) Radiation-induced alterations of the proliferation dynamics of human skin fibroblasts after repeated irradiation in the subtherapeutic dose range. *Strahlenther. Oncol.* **171**, 35—41.

[28] Parenteau, N. L. , Nolte, C. M. , Bilbo, P. , Rosenberg, M. , Wilkins, L. M. , Johnson E. W. , et al. (1991) Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications. *J. Cell Biochem.* **45**, 245—251.

[29] Smola, H. , Stark, H. J. , Thiekötter, G. , G. , Mirancea, N. , Krieg, T. , and Fusenig, N. E. (1998) Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp. Cell Res.* **239**, 399—410.

[30] Maas-Szabowski, N. , Stark, H. J. , and Fusenig, N. E. (2002) Cell interaction and epithelial differentiation, in Culture of Epithelial Cells, 2nd ed. (Freshney, I. R. , and Freshney, M. G. , eds.), Wiley-Liss, Inc. , New

York, pp. 31—63.

[31] Gratzner, H. G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**, 474—475.

[32] Cattoretti, G., Becker, M. H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J., and Gerdes, J. (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.* **168**, 357—363.

[33] Maas-Szabowski, N., Shimotoyodome, A., and Fusenig, N. E. (1999) Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J. Cell Sci.* **112**, 1843—1853.

[34] Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N. E., et al. (2000) c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* **103**, 745—755.

[35] Breitkreutz, D., Bohnert, A., Herzmann, E., Bowden, P. E., Boukamp, P., and Fusenig, N. E. (1984) Differentiation specific functions in cultured and transplanted mouse keratinocytes: Environmental influences on ultrastructure and keratin expression. *Differentiation* **26**, 154—169.

[36] Mackenzie, I., Rittman, G., Bohnert, A., Breitkreutz, D., and Fusenig, N. E. (1993) Influence of connective tissues on the in vitro growth and differentiation of murine epidermis. *Epithelial Cell Biol.* **2**, 107—119.

[37] Kaur, P., and Carter, W. G. (1992) Integrin expression and differentiation in transformed human epidermal cells is regulated by fibroblasts. *J. Cell Sci.* **103**, 755—763.

[38] Noser, F. K. and Limat, A. (1987) Organotypic culture of outer root sheath cells from human hair follicles using a new culture device. *In Vitro Cell Devel. Biol.* **23**, 541—545.

[39] Detmar, M., Schaart, F. M., Blume, U., and Orfanos, C. E. (1993) Culture of hair matrix and follicular keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 130—134.

[40] Kopan, R. and Fuchs, E. (1989) The use of retinoic acid to probe the relation between hyperproliferation-associated keratins and cell proliferation in normal and malignant epidermal cells. *J. Cell Biol.* **109** (**1**), 295—307.

[41] Chen, Y. Q., Mauviel, A., Ryynanen, J., Sollberg, S., and Uitto, J. (1994) Type VII collagen gene expression by human skin fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of donor age and cytokine responses. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 205 209.

[42] Gregoire, L., Munkareh, A., Rabah, R., Morris, R. T., and Lancaster, W. D. (1998) Organotypic culture of human ovarian surface epithelial cells: a potential model for ovarian carcinogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **34**, 636—639.

[43] Tomakidi, P., Breitkreutz, D., Fusenig, N. E., Zoller, J., Kohl, A., and Komposch, G. (1998) Establishment of oral mucosa phenotype in vitro in correlation to epithelial anchorage. *Cell Tissue Res.* **298**, 355—366.

[44] Schoop, V. M., Mirancea, N., and Fusenig, N. E. (1999) Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic cucultures with human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 343—353.

[45] Maas-Szabowski, N., Starker, A., and Fusenig, N. E. (2003) Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF-α. *J. Cell Sci.* **116**, 2937—2948.

[46] Vaccariello, M., Javaherian, A., Wang, Y., Fusenig, N. E., and Garlick, J. A. (1999) Cell interactions control the fate of malignant keratinocytes in an organotypic model of early neoplasia. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 384—391.

[47] Cerezo, A., Stark, H. J., Moshir, S., and Boukamp, P. (2003) Constitutive overexpression of human telomerase reverse transcriptase but not c-myc blocks terminal differentiation in human HaCaT skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 110—119.

[48] Regnier, M., Staquet, M. J., Schmitt, D., and Schmidt, R. (1997) Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 510—512.

[49] Laning, J. C., DeLuca, J. E., and Hardin-Young, J. (1999) Effects of immunoregulatory cytokines on the im-

munogenic potential of the cellular components of a bilayered living skin equivalent. *Tissue Eng*. **5**, 171—181.

[50] Black, A. F., Berthold, F., L'Heureux, N., Germain, L., and Auger, F. A. (1998) In vitro reconstruction of a capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J*. **12**, 1311—1340.

[51] Kopan, R., Traska, G., and Fuchs, E. (1987) Retinoids as important regulators of terminal differentiation: examining keratin expression in individual epidermal cells at various stages of keratinization. *J. Cell Biol*. **105**, 427—440.

[52] Chen, C. S. J., Lavker, R. M., Rodeck, U., Risse, B., and Jensen, P. (1995) Use of a serumfree epidermal culture model to show deleterious effects of epidermal growth factor on morphogenesis and differentiation. *J. Invest. Dermatol*. **104**, 107—112.

[53] Asselineau, D. and Prunieras, M. (1984) Reconstruction of simplified skin: control of fabrication. *Br. J. Dermatol*. **111**, 219—222.

[54] Mauch, C., Kozlowska, E., Eckes, B., and Krieg, T. (1992) Altered regulation of collagen metabolism in scleroderma fibroblasts growth within three-dimensional collagen gels. *Exp. Dermatol*. **1**, 185—190.

[55] Atula, S., Grenman, R., and Syrjänen, S. (1997) Fibroblasts can modulate the phenotype of malignant epithelial cells in vitro. *Exp. Cell Res*. **235**, 180—187.

[56] Fusenig, N. E., Skobe, M., Vosseler, S., Hansen, M., Lederle, W., Airola, K., et al. (2002) Tissue models to study tumor-stroma interactions, in *Proteases and Their Inhibitors in Cancer Metastasis* (Muschel, R. J. and Foidard, J. M., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 205—223.

[57] Fusenig, N. E., Breitkreutz, D., Lueder, M., Boukamp, P., and Worst, P. K. M. (1981) Keratinization and structural organization in epidermal cell cultures, in *International Cultures Cell Biology 1980—1981* (Schwaiger, H. G., ed.), Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 1004—1014.

[58] Breitkreutz, D., Stark, H. J., Mirancea, N., Tomakidi, P., Steinbauer, H., and Fusenig, N. E. (1997) Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes—implications for epithelial homeostasis. *Differentiation* **61**, 195—209.

[59] Meuth, M. and Green, H. (1974) Induction of a deoxycytidineless state in cultured mammalian cells by bromodeoxyuridine. *Cell* **2**, 109—112.

第 7 章　工程化人体皮肤的体外构建

Alexander Margulis，Weitian Zhang，Jonathan A. Garlick

摘　要：在体外构建出模拟人体皮肤生物化学和形态学特性的人体表皮组织被称为皮肤等同物或器官型培养物，这一技术已经为皮肤生物学研究开辟了崭新的途径。本章介绍了从这些组织的构成部件产生相应组织的方法，还描述了在皮肤等同物中让人角质形成细胞和成纤维细胞达到最佳生长的培养条件。将这些细胞类型进行组合，胶原凝胶中含有真皮成纤维细胞，而角质形成细胞就生长在已收缩胶原凝胶的气-液相交界面上。本章所描述的这些方法能产生出类似于体内组织结构和表型的人体表皮组织。

关键词：皮肤等同物；表皮；人角质形成细胞；成纤维细胞；器官型培养

1　导言

为了加深对表皮细胞生物学特性的了解，三维人体组织模型的研发需要具备工程化组织的能力，而且这些组织能切实模拟出体内的相应组织。当细胞在三维空间中被有机组合并显示出体内所见到的结构特征时，具有生物学意义的各种信号转导通路就会最佳地介导细胞增殖和分化功能之间的联系；而在二维的培养体系中这些信号通路则失去偶联甚至消失[1,2]。过去十多年，人们所研发的组织工程模型模拟了人体皮肤，被称为皮肤等同物或器官型培养物。这些模型为研究表皮的生物学特性提供了新颖的实验体系。器官型培养物就是一种体外培养的组织，它由含有真皮成纤维细胞的胶原基质及其气-液相界面上生长的复层鳞状上皮组成。这样产生的三维组织显示出与体内相似的上皮分化和形态，且细胞分裂速度也与在人体皮肤所发现的类似。本章将描述如何从组织的构成成分产生器官型培养物。首先介绍浸没培养法分别制备单层角质形成细胞和单层成纤维细胞，然后介绍如何将这些细胞成分掺入到器官型培养物中。依照本实验方案可以产生出与人体表皮形态、分化和生长类似的人体组织。

2　材料

2.1　浸没培养

2.1.1　角质形成细胞浸没培养的培养基

(1) 人角质形成细胞的来源：新生儿包皮［平均大小为 1～2 cm^2；见注意事项(1)］。

(2) 角质形成细胞培养基

a. 3∶1 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM）/Ham F12 培养基；DMEM（Invitrogen，Carlsbad，CA；cat. no. 31600-083），Ham F12（Invitrogen；cat. no. 21700-108）。

b. 5%胎牛血清（Hyclone Laboratories，Logan，UT；cat. no. SH30071. 03）。

c. 青霉素-链霉素溶液（青霉素和链霉素的终浓度分别为 100 IU/ml 和 100 μg/ml）：青霉素（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. P-3032）和链霉素（Sigma；cat. no. S-6501）。

d. HEPES（Sigma；cat. no. H-4034）：将 47. 24 g HEPES 溶解于 250 ml 双蒸水中，制成 100×的储存液。过滤除菌，分装，－20℃保存。

e. 腺嘌呤（ICN，Aurora，OH；cat. no. 100190）：将 0. 972 g 腺嘌呤溶解于 2. 4 ml 的 4 mol/L NaOH 中，双蒸水定容至 400 ml，以配成 100×的储存液（18 mmol/L），－20℃保存。

f. 霍乱毒素（ICN；cat. no. 190329）：溶解成 9 ng/ml，即为 1000×的储存液，－20℃保存。

g. 表皮生长因子（Austral Biological，San Ramon，CA；cat. no. GF-010-9）：在 0. 1%牛血清白蛋白中溶解成 10 μg/ml，即为 1000×的储存液，－20℃保存。

h. 氢化可的松（Sigma；cat. no. H-4881）：将 0. 0538 g 氢化可的松溶解于 200 ml 双蒸水，即配成 500×的储存液（0. 269 mg/ml），－20℃保存。

i. 胰岛素（EMD Biosciences，San Diego，CA；cat. no. 40769）：10 ml 0. 005 mol/L HCl 中溶解 50 mg 胰岛素，配成 1000×的储存液（5 mg/ml），－20℃保存。

注：所有的成分可在－20℃保存一年。

2. 1. 2 用于角质形成细胞浸没培养的成纤维细胞（饲养细胞层）

（1）用辐照过的 3T3-J2 细胞作为饲养细胞[3]。

（2）3T3 培养基

a. DMEM（见 2. 1. 1）。

b. 10%胎牛血清（Hyclone；cat. no. SH30072. 03）。

c. 青霉素-链霉素（其浓度分别为 100 IU/ml 和 100 μg/ml；见 2. 1. 1）。

d. HEPES（见 2. 1. 1）。

2. 2 器官型培养

2. 2. 1 用于器官型培养的成纤维细胞

（1）人成纤维细胞的来源：新生儿包皮（平均大小为 1～2 cm^2）。

（2）成纤维细胞的组织培养基

a. DMEM（见 2. 1. 1）。

b. 10%胎牛血清（见 2. 1. 1）。

c. 青霉素-链霉素（其浓度分别为 100 IU/ml 和 100 μg/ml）（见 2. 1. 1）。

d. HEPES（见 2. 1. 1）。

2.2.2 制作胶原基质的材料（表 7.1）

（1）人包皮成纤维细胞培养成铺满状态。

（2）6 孔组织培养板配有 3 μm 多孔聚碳酸酯膜的嵌入小室（Organogenesis，Canton，MA；cat no. MS-10-305）。

（3）牛肌腱 I 型胶原（Organogenesis；cat. no. 200-201）。

（4）含有 Earle 盐的 10×最低基础培养基（DMEM）（Cambrex，Walkersville，MD；cat. no. 12-684F）。

（5）胎牛血清（Hyclone；cat. no. SH30071.01）。

（6）L-谷氨酰胺（200 mmol/L；Cambrex；cat. no. 17-605E）。

（7）碳酸氢钠（71.2 mg/ml；Cambrex；cat. no. 17-613E）。

（8）成纤维组织培养液（见 2.1.1）。

（9）Green 胰蛋白酶（2 L）：

a. 2 g 胰蛋白酶 1-300（ICN；cat. no. 103140）。

b. 2 g 葡萄糖（Sigma；cat no. G-7528）。

c. 200 ml 10×磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）。

d. 0.2 g 链霉素（见 2.1.1）。

e. 0.2 g 青霉素（见 2.1.1）。

将上述原料在冰上混合，用双蒸水调整体积到 2 L，加入数滴 2 mol/L NaOH 把 pH 调为 7.25～7.40。滤纸过滤胰蛋白酶溶液，再用 Nalgene 滤器过滤除菌（Nalgene filter；Fisher，Pittsburgh，PA；cat. no. 09-740-32）。分装保存于－20℃可长达 1 年。

表 7.1 掺入真皮成纤维细胞的胶原基质成分

	6 ml 无细胞基质（1 ml/嵌入小室）	18 ml 细胞基质（3 ml/嵌入小室）
10×DMEM	0.60 ml	1.65 ml
L-谷氨酰胺	0.05 ml	0.15 ml
胎牛血清	0.70 ml	1.85 ml
碳酸氢钠	0.17 ml	0.52 ml
胶原	4.60 ml	14.00 ml
成纤维细胞	—	4.5×10^5 个细胞/1.5 ml 成纤维细胞培养基

2.2.3 器官型培养的培养基（表 7.2）

（1）改良的 DME：这种 DME 是 JRH 公司的一种特殊配方（JRH Inc.，Lenexa，KS，cat. ＃56430-10 L），需要大量订货。0.0086 g DME 粉末与 0.0001 g 硫酸镁和 0.0037 g 碳酸氢钠一起溶解于 1 ml 双蒸水中。

（2）Ham's F12（见 2.1.1）。

（3）L-谷氨酰胺（见 2.2.2）：200 mmol/L 为 500×的储存液。

（4）氢化可的松（见 2.1.1）。

（5）ITES（Cambrex；cat. no. 17-839Z）：含有胰岛素（5 μg/ml）、转铁蛋白

(5 μg/ml)、乙醇胺 (5 μg/ml) 和硒 (5 μg/ml)。

(6) 三碘甲腺原氨酸 (Sigma; cat. no. T-5516): 将其1 mg溶解于1 ml的1 mol/L NaOH中，再添加19 ml的DMEM (50 μg/ml)，然后取4μl稀释于31 ml DMEM中，制成500×的储存液 (10^9 mol/L)。

(7) O-磷酸乙醇胺 (Sigma; cat. no. P-0503): 在100 ml DME中溶解705 mg，配成500×的储存液 (50 mmol/L)。

(8) 腺嘌呤 (Sigma; cat. no. A-9795): 溶解1.55 g于100 ml的酸化水中，37℃水浴中加温，制成500×的储存液 (90 mmol/L)。

(9) 氯化钙: 溶解3.55 g于20 ml双蒸水中，制成500×的储存液 (1.6 mol/L)。

(10) 黄体酮 (Sigma; cat. no. P-8783): 溶解1 mg于1 ml无水乙醇中，再添加14.7 ml的双蒸水。取1 ml稀释于100 ml的DMEM中，制成500×的储存液 (2×10^9 mol/L)。

(11) 血清

a. 已螯合的胎牛血清 (cFBS)。将10 g CHELEX 100 (Sigma; cat. no. C-7901) 和100 ml血清混合，置于冷库中搅拌3 h来制备cFBS (见2.2.2)，然后用Whatman滤纸过滤血清，最后过滤除菌 [见注意事项 (2)]。

b. 胎牛血清 (FBS)。

表7.2 总体积为体积1 L的培养基配方[a]

	表皮化培养基 I	表皮化培养基 II	角化培养基
改良的DME	725	725	474
Ham's F12	240	240	474
L-谷氨酰胺	20	20	20
氢化可的松	2	2	2
ITES	2	2	2
O-磷酸乙醇胺	2	2	2
$CaCl_2$	2	2	2
三碘甲腺原氨酸	2	2	2
黄体酮	2	2	—
腺嘌呤	2	2	2
血清	1 (cFBS)	1 (FBS)	20 (FBS)

a. 所有的体积单位为ml。

2.2.4 在已收缩的胶原凝胶上接种结缔组织支持物 [见注意事项 (3)]

(1) 去细胞的人真皮 (Alloderm™, LifeCell Inc., Branchburg, NJ; cat. no. 102-009)。

(2) 带有单一基底膜成分的各种嵌入小室 (均购于Becton-Dickinson Inc.): I型胶原 (cat. no. 354442)，I型层粘连蛋白 (cat. no. 354446)，原纤维状胶原 (cat. no. 354472)，纤维结合蛋白/I型胶原 (cat. no. 354633)，纤维结合蛋白 (cat. no. 354440)，IV型胶原 (cat. no. 354544)。

（3）1.4 cm的不锈钢皮肤打孔器（Delasco，Inc，Council Bluffs，IA；cat. no. KP-14）。

3 方法

3.1 器官型培养中掺入成纤维细胞的方法

3.1.1 制作用于掺入胶原基质中的成纤维细胞浸没培养物

培养人包皮的成纤维细胞，使其在制作胶原基质的前一天已铺满瓶底。将细胞高密度传代（9∶10），如是则次日使用时细胞可再次铺满［见注意事项（4）］。

3.1.2 胶原基质的构建（图7.1）

将下列成分在100 ml无菌的培养瓶中混合，置于冰上，用于产生无细胞的胶原凝胶层和可收缩的有细胞胶原凝胶层。其目的是先制备出一薄层无细胞的胶原，以其作为含细胞胶原的衬底。这将能够防止含细胞的胶原凝胶层在嵌入小室薄膜的表面上完全收缩［见注意事项（5）］。

（1）将所有的成分保持在冰上，按照表7.1的顺序混合无细胞基质成分，每个小室加入1 ml［见图7.1的（2）］。溶液的颜色应该呈草黄色至淡粉红色。任何偏离此颜色的改变均提示pH的变化，胶原可能不会形成凝胶。如果最终溶液的颜色呈亮黄色，可慢慢滴入更多的碳酸氢钠直到变成草黄色。确保混合物完全覆盖嵌入小室的底部，一旦把凝胶混合物倒入小室，应在室温下静置。在胶原凝胶完全聚合（10～15 min）前，不要移动小室。当凝胶发生聚合时，基质的颜色将变成粉红色［见注意事项（5）］。

（2）在无细胞基质正在聚合时，可用胰蛋白酶消化成纤维细胞，计数细胞，并以成纤维细胞培养基重悬细胞使其终浓度为3.0×10^{5}个细胞/ml。重悬时应充分吹散细胞，因为细胞必须以单个细胞的形式掺入胶原凝胶中。

（3）制作含细胞的基质，应将所有成分保持于冰上并按表7.1的顺序混合。如果混合后还需要调整溶液的颜色，可缓慢滴加碳酸氢钠。成纤维细胞应该在最后加入，这是因为加入胶原可中和混合物的pH，这样细胞就不至于被碱性pH所损害。轻柔混匀使细胞均匀地悬浮于胶原中，每个嵌合小室加入3 ml混合物，室温下让混合物形成凝胶［见图7.1的（3）］。当凝胶已完全凝固呈粉红色时，这一过程一般在30 min内完成。至此，可用12 ml成纤维细胞培养基覆盖凝胶，其中培养孔的底部加入10 ml，嵌合小室的上部加入2 ml［见图7.1的（4）］。孵育凝胶5～7 d直到凝胶收缩完成［见注意事项（6）］且不再收缩为止［见图7.1的（5）］。

3.2 在器官型培养物中角质形成细胞的培养方法

3.2.1 胶原基质上接种角质形成细胞

（1）首先必须决定细胞是直接生长在已收缩胶原凝胶的表面，还是在去细胞真皮的表面，或是在包被聚碳酸酯膜的嵌入小室表面［见注意事项（7）］。如果使用去细胞真皮，就必须用皮肤打孔机将它裁剪成已收缩胶原凝胶的直径大小，在37℃用PBS再水

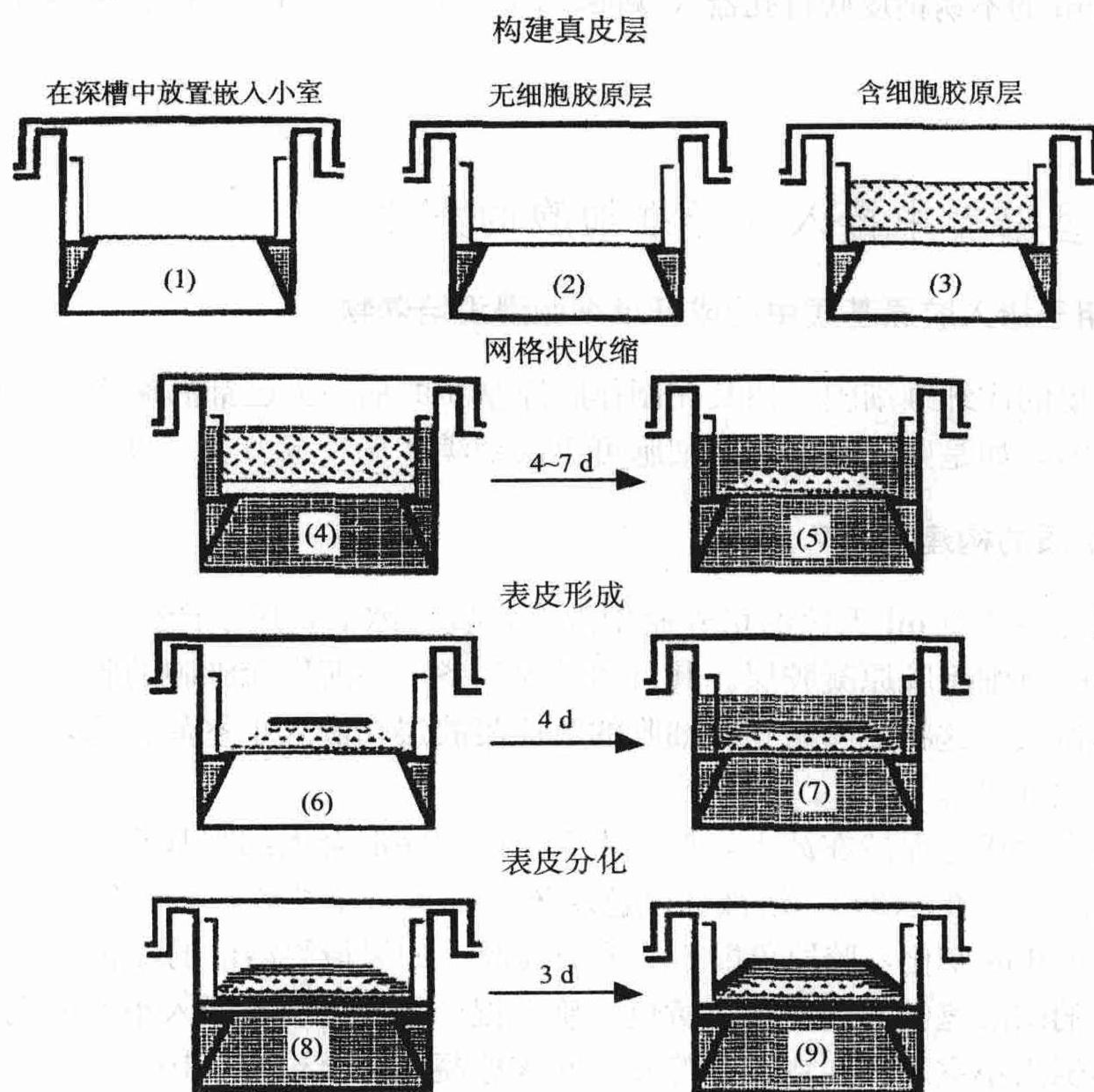


图 7.1 构建直接生长在已收缩胶原凝胶上的器官型培养物

(1) 深孔培养板中的嵌入小室；(2) 在嵌入小室的聚碳酸酯膜上加入 1 ml 无细胞胶原，形成一层凝固的凝胶；(3) 无细胞胶原凝胶上再加入 3 ml 含细胞胶原，并凝聚成凝胶；(4) 和 (5) 胶原凝胶从嵌入小室胶原的边缘开始收缩，形成一个中心隆起的区域；(6) 在嵌入小室的中心隆起区域接种 50 μl 角质形成细胞悬液 (5×10^5 个细胞/小室)；(7) 维持浸没培养 7 d，让角质形成细胞完全覆盖胶原并早期分化；(8) 和 (9) 将正在发育中的组织培养物升至气-液相界面处。

化 1 h。包被的嵌入小室则用手术刀片从塑料嵌入小室的边沿切下已包被的聚碳酸酯膜，然后置入无血清 DMEM 培养基内 37℃再水化 1 h。还有一种方法就是将角质形成细胞直接种植于已收缩的胶原凝胶上进行培养［见图 7.1 的 (6)①］。

(2) 采用饲养细胞层体系，必须在角质形成细胞生长到铺满程度低于 50%时，就用胰蛋白酶进行消化，以减少所接种角质形成细胞中的分化细胞数量［见注意事项 (2)］。在细胞培养板中加入含 EDTA 的 PBS，37℃孵育 2 min，可将 3T3 细胞从培养物中去除。轻柔吹打，3T3 细胞将脱离细胞培养板，而角质形成细胞仍保持附着状态。注意不要让培养物在含 EDTA 的 PBS 中孵育时间过长，因为这可能也会导致角质形成细胞脱落。一旦 3T3 细胞开始脱落，马上用 PBS 代替含 EDTA 的 PBS，轻柔地漂洗培养板数次，直到 3T3 细胞全部脱落而只留下角质形成细胞的小集落。

---

① 原文此处为图 7.1B。——译者注

(3) 用 Green 胰蛋白酶/EDTA 溶液消化角质形成细胞集落，37℃孵育 5 min，以获得单个细胞的悬液。一旦细胞分离，用角质形成细胞培养基轻柔地重悬细胞，计数，在15 ml 试管中加入适量的细胞，以便有足够的细胞（5×10^5 个细胞/小室）接种到所需数量的嵌入小室内。

(4) 2000 *g* 离心 5 min。

(5) 从胶原基质培养板中去掉所有的成纤维细胞培养基，此时，可将去细胞真皮或包被过的聚碳酸酯膜直接铺在胶原基质上。另一种方法就是将角质形成细胞直接种植于已收缩的胶原凝胶上。

(6) 重悬角质形成细胞以便用小体积的细胞悬液接种到基质上。在很小的结缔组织表面（直径 1.4 cm）上接种 5×10^5 万个细胞的关键就是用小体积重悬角质形成细胞。操作方法是：以 1 ml 的无菌塑料吸管加入 50μl 表皮化培养基 I 到盛有 5×10^5 个角质形成细胞的 15 ml 试管中。用 1 ml 的塑料吸管轻柔地吹散细胞沉淀，转移到 1.5 ml 无菌微量离心管中。再用 200μl 移液器轻柔地重悬细胞沉淀，直到均匀混悬呈云雾状，转移 50μl 细胞悬液到已收缩胶原凝胶的中心区域。静置培养板 10 min 以便细胞开始黏附。在没有任何培养基的情况下，37℃孵育 30～60 min，可以让角质形成细胞完全黏附。

(7) 此时加入 12 ml 表皮化培养基 I，其中 10 ml 加在培养孔的底部，2 ml 加在嵌入小室角质形成细胞的上面，37℃孵育培养物［见图 7.1 的（6）；见注意事项（8）］。

(8) 每两天按下列方法换液

a. 表皮化培养基 I：12 ml 用在开始的 2 d。

b. 表皮化培养基 II：12 ml 用在随后的 2 d［见图 7.1 的（7）］。

c. 角化培养基：仅在培养孔的底部加入 6.5 ml 角化培养基，培养物就可提升至气-液相界面，这样嵌入小室的底部刚好接触到培养液的界面。每两天用角化培养基换液 1 次，每次 6.5 ml［见图 7.1 的（8）和（9）；见注意事项（9）］。

3.2.2 处理用于形态学和免疫组化分析的组织［见注意事项（10）］

(1) 用 PBS 轻柔地漂洗器官型培养物两次。

(2) 用手术刀从塑料嵌入小室切其底部的膜。

(3) 将培养物切成两半，其中一半置于一托架中，迅速浸泡于 10%甲醛中。因组织很薄，故只需几个小时的固定就可以进行石蜡包埋。如果在 24 h 内还不进行石蜡处理，就应该用 50%乙醇代替甲醛。

(4) 另一半组织置于 2 mol/L 蔗糖水溶液中［见注意事项（10）］，在 4℃浸泡至少 1 h，但不要超过 24 h。

(5) 为了对蔗糖溶液浸泡过的组织包埋后再进行冷冻保存，先用铝箔和一直径为 2 cm 的小瓶盖制作一个小模具，其中填充 3/4 体积的包埋剂。

(6) 用尖细的镊子小心地从蔗糖溶液中取出组织，保证组织不脱离它所附着的尼龙膜。小心地将组织的尼龙膜一侧接触薄纸巾以去除多余的蔗糖溶液。

(7) 用薄刮勺在组织的尼龙膜一侧将组织小心提起，放入包埋剂中，轻柔地用镊子夹住组织的顶部以移走刮勺。

(8) 在室温下将组织浸于包埋剂中 20～30 min，这有助于防止在切片过程中组织

与包埋剂结合。

（9）在聚苯乙烯泡沫盒中置一金属试管架，填充液氮使其平面稍低于试管架。将铝箔模具置于试管架上，用镊子轻轻固定组织的顶部使之处于直立位，并在 1 min 以内保持此位置。放开样本后，注意确保组织在液氮蒸气中逐渐冰冻的时候仍处于直立位。

（10）组织将在 5 min 内完全冻结，可置于小盒中保存于－80℃。

4 注意事项

（1）虽然所介绍的这些方法是利用皮肤角质形成细胞构建器官型培养物，但也适用于其他复层上皮的组织培养，如口腔和子宫颈黏膜、食管黏膜、结膜及喉的上皮。这提示应该在单层培养中努力优化这些细胞的生长条件，然后将它们掺入到器官型培养物中。

（2）角质形成细胞最初在含已螯合胎牛血清的低钙培养基里培养的理由是让其获得最佳的生长。这一步骤有利于接种的角质形成细胞在器官型培养中完全覆盖结缔组织表面。

（3）本实验方案所提供的技术可允许上皮组织在各种结缔组织的基质上生长。这些培养体系中的任何一种都有其特殊的用途，可用于满足特定实验的需求。生长在去细胞真皮（AlloDerm）上的组织可作为迅速组装基底膜结构和完善组织形态的一个界面[4]。AlloDerm 可以从 LifeCell 公司（Branchburg，NJ）获得，已应用于烧伤、牙周病和外科缺损等多种临床疾病的治疗[7]。直接生长在已收缩胶原凝胶上的组织虽没有形成完整的基底膜，但是可为角质形成细胞的生长和分化提供优越的支持条件[4]。在包被有特定细胞外基质蛋白的聚碳酸酯膜上生长的培养物，可以用于直接研究这些蛋白质对组织结构和表型的影响（见 2.2.4）。图 7.2 显示了在不同基质上培养组织的实例。

（4）我们已发现，成纤维细胞株在加入胶原凝胶后对角质形成细胞生长的支持效应存在一定程度的差异。我们已见到，成纤维细胞介导的支持角质形成细胞生长的效应直接与成纤维细胞可使胶原基质收缩的程度相关。在加入角质形成细胞前，对胶原凝胶有更强收缩能力的成纤维细胞株，能更好地支持角质形成细胞的生长。这一参数可在器官型培养中用于筛选成纤维细胞株，以获得最佳的生长支持效果。

（5）胶原凝胶的构建需要把所有的组分一直保持在冰上，直到凝胶混合物加到嵌入小室中，这样就可以保证胶原不会过早地从这些溶液中沉淀。用来吸取胶原的塑料吸管应该事先预冷。

（6）为了使产生的组织具有正常的组织结构，至关重要的是接种到器官型培养中的角质形成细胞要具有较强的生长潜力。几乎所有接种到器官型培养物中的角质形成细胞都会黏附于相应的结缔组织基质表面，但是只有增殖性细胞才会在接种后生长。浸没培养条件下已开始终末分化的角质形成细胞也会黏附于基质，但是不会形成生长活跃、分层良好的器官型培养物。因此，重要的是将角质形成细胞传代到器官型培养时，单层培养物中的角质形成细胞需具有高比例的生长活跃细胞。这可以通过在浸没培养的 3T3 细胞饲养层上生长出高克隆密度、小集落的角质形成细胞来实现。此时细胞终末分化降至最少，而增殖性细胞组分变得最多。另一种替代方法也可以实现这一目标，即在无

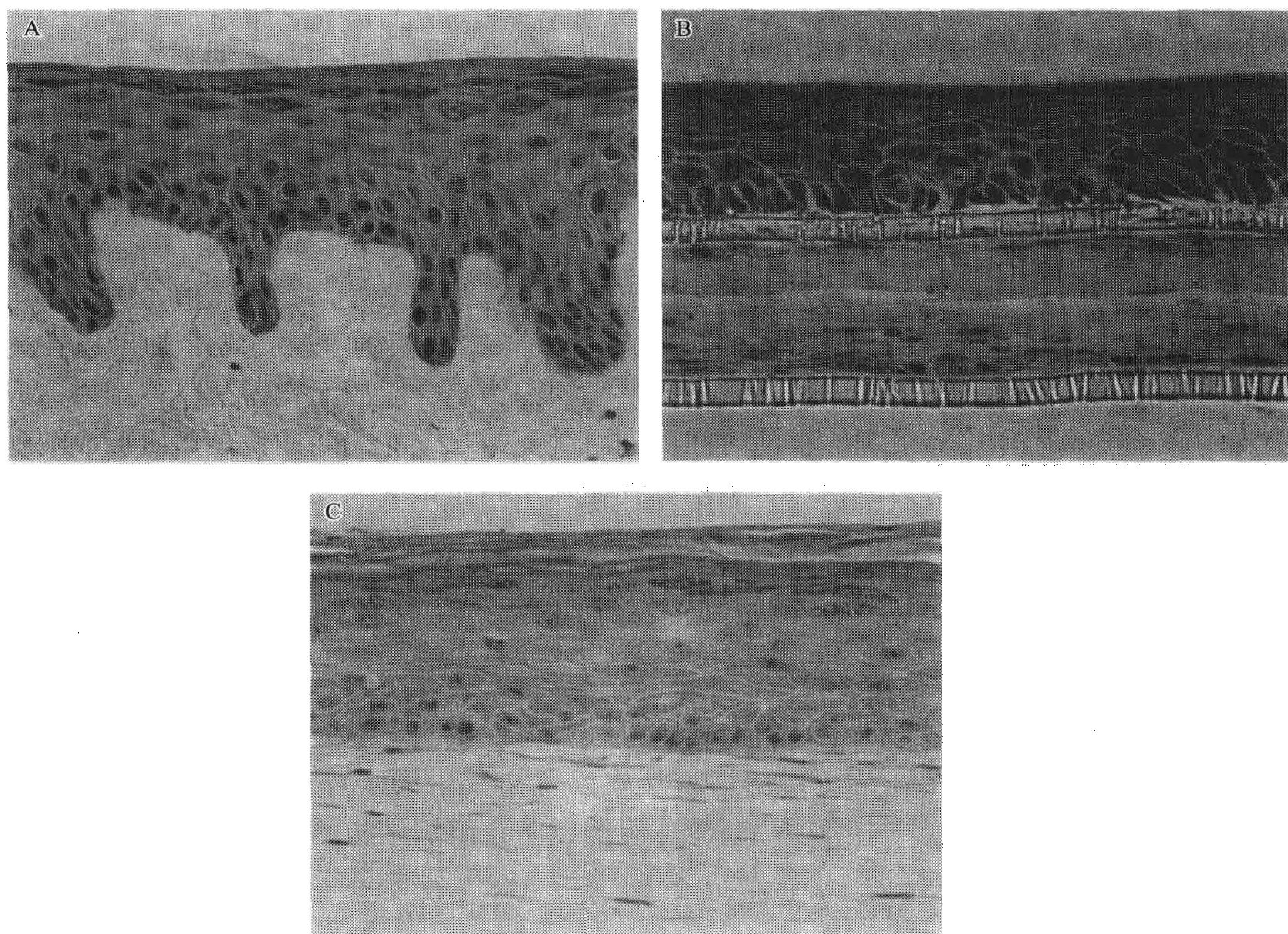


图 7.2　人复层鳞状上皮生长在不同结缔组织基质上的形态表现

当角质形成细胞生长在无细胞真皮表面时，表皮表现出与活体相似的结构和组织，可见立方形的基底细胞巢状分布于波浪形的钉突中，以及界限清楚的棘层、颗粒层和角质层（A）。当角质形成细胞生长在包被 IV 型胶原的聚碳酸酯膜表面时，表皮组织分层良好并出现极化的基底细胞和形态良好的棘层（B）。当细胞直接生长在已收缩的 I 型胶原基质表面时，可见细胞的形态学分化类型出现了轻度的改变，细胞的分层不如在无细胞真皮的培养物中那样清晰，而且未见极化的基底细胞层（C）。

3T3 成纤维细胞层的条件下，采用低钙的已知成分培养基培养角质形成细胞，然后再传代到器官型培养中。我们已发现，当以不同角质形成细胞和成纤维细胞株混合培养时，器官型培养物的生长和形态学会发生改变。因此，可通过器官型培养来检测角质形成细胞株，从而提供最佳生长和形态分化的角质形成细胞株。这也可以在单层的饲养层细胞培养物中检测角质形成细胞株的克隆形成生长状况，从而判定这些细胞的生长潜力。

（7）应该牢记的是，虽然在器官型培养物中生长的角质形成细胞与人体皮肤中的角质形成细胞共享许多形态和生化特征，但它们在表型上的确存在着某些不同。例如，正常情况下在皮肤中不能表达的整合素受体，却可以构成性地表达在器官型培养的角质形成细胞中。另外，这些培养物在屏障功能方面也有一定程度的缺陷。一个很好的想法是将生长在体外器官型培养物中的角质形成细胞和活体内新近再上皮化刚愈合创面的角质形成细胞进行比较，创面中的细胞虽然形态学完全分化，但是细胞仍然处于一定程度“激活”的状态。

(8) 在器官型培养中研究角质形成细胞表型的优点，在于有能力控制和修改组织生长的细胞环境。比如，有可能在培养中直接添加一些可溶因子，来测定细胞表型对这些环境条件的反应[5]。在胶原凝胶收缩后可以从培养物中去除成纤维细胞，而培养物在无成纤维细胞的条件下生长就改变了它的生长环境[4]。此外，由于直接给培养基添加一次5-溴脱氧尿苷，就有可能直接检测到细胞增殖指数的改变，因此，对环境的控制有助于分析各种培养的组织。

(9) 关于器官型培养物中角质形成细胞行为的一些微细之处，有几点值得关注。第一点就是将培养物维持在气-液相界面的时间长短。根据我们的经验，培养物可以在此界面上保持长达 10～14 d。此时，上皮组织的表层因为不会脱屑而变得很厚，结果造成上皮的底层被挤压，培养组织的存活时间受到限制。第二个相关问题就是角质形成细胞在器官型培养中的生长潜力。当器官型培养物显示出高于正常人皮肤细胞增殖的基础水平时[4]，已经表明这些培养物具有非常大的细胞生长潜力并对外来生长刺激因子的反应非常敏感。例如，通过“创伤”造成器官型培养物的破坏会引起基底细胞的增殖能力增强 10 倍[5,6]。

(10) 如前所述，非常关键的是，在培养结束后的组织处理过程中保存组织的结构。因为胶原凝胶含水量很高，所以在组织处理过程中可发生明显的人为损害。正是因为这个原因，应将组织浸泡在 2 mol/L 蔗糖溶液中以置换其中的水分和预防冷冻损害（见3.2.2)。此外，在液氮蒸气中必须逐渐冷冻组织以防止组织结构的破坏，切忌直接将培养物浸泡在液氮中速冻。

（朱崇涛 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Hagios, C., Lochter, A., and Bissell, M. J. (1998) Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **353**, 857—870.

[2] O'Brien, L. E., Zegers, M. M., and Mostov, K. E. (2002) Opinion: building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 531—537.

[3] Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermalkeratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331—343.

[4] Andriani, F., Margulis, A., Lin, N., Griffey, S., and Garlick, J. A. (2003) Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 923—931.

[5] Garlick, J. A. and Taichman, L. B. (1994) Effect of TGF-β1 on re-epithelialization of human keratinocytes in vitro: an organotypic model. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 554—559.

[6] Garlick, J. A. and Taichman, L. B. (1993) The fate of genetically marked human oral keratinocytes in vitro. *Arch. Oral Biol.* **38**, 903—910.

[7] Wainwright, D. J. (1995) Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns* **21**, 243—248.

第二部分　表皮干细胞

第 8 章　表皮干细胞的体内标记和分析

Wei-Yang Wu，Rebecca J. Morris

摘　要：为了识别小鼠皮肤表皮组织中慢周期（标记滞留）的角质形成细胞，新生雌性小鼠在出生后的第三天开始注射［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷，每天两次，共 3 d。到 8～10 周龄时，从小鼠的背部获取皮肤组织并固定，石蜡包埋后进行连续切片备用。经过脱蜡和乙醇处理的玻片干燥后浸入放射自显影感光乳胶中，随后置于不透光盒中 4℃干燥 4 周，再用照相定影剂进行定影，清洗后轻微染色，在光学显微镜下观察并定量标记滞留的细胞。细胞核为黑色银粒所标记的细胞被鉴定为标记滞留细胞。

关键词：毛囊；放射性标记；放射自显影；小鼠；皮肤

1　导言

来源于皮肤表皮组织的角质形成细胞中存在着增殖性细胞亚群，它们有许多不同的特征，如组织中的定位、对化学处理的反应、体内或体外的分裂行为、形态学及标记蛋白质的表达等。这些参数中的每一项都有助于确认一个可能包含干细胞的细胞亚群，但其中任何单独一项都不能成为一个公认且具有可操作性的角质形成细胞干细胞的定义。然而，综合考虑这些特征就为表皮干细胞的鉴定和分离提供了极大的可能性。

本章主要介绍最早用于鉴定小鼠皮肤上皮角质形成细胞干细胞的技术中的一种：利用光学显微镜可见的放射自显影技术来鉴定慢周期（标记滞留）的角质形成细胞。自从这种鉴定技术首次应用以来[1]，包括我们实验室在内的一些实验室，利用［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷连续标记及随后示踪的多种改进方法，已经鉴定出角质形成细胞的几个亚群，尤其是表皮增殖单位的中央细胞和毛囊膨隆部的细胞[2]。所有这些改进方法的根本前提是：当所有表皮细胞正在进行 DNA 合成时，对 DNA 分子进行标记；在随后的追踪期间，标记在更为快速增殖的细胞中稀释或丢失，剩下的慢周期细胞就可通过放射自显影的方法鉴定出来。下面的实验步骤就是我们实验室用来鉴定标记滞留细胞的方法。

2　材料

2.1　小鼠

（1）妊娠 13 d 的小鼠。小鼠可以从 Charles Rivers 公司订购，且要求到达时间为妊娠期 13 d。

2.2 注射材料

(1) 30 号 0.5 in (1.27 cm) 长的注射针头 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; cat. no. 3. 5106)。

(2) 1 ml 注射器 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; cat. no. 309602)。

(3) 无菌纱布垫 (Johnson & Johnson, Arlington, TX; cat. no. 2315)。

(4) 26 号 5/8 in (1.59 cm) 长的注射针头 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; cat. no. 305115)。

(5) 5 ml 注射器 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; cat. no. 9603)。

(6) 一次性塑料笼 (Ancare, Bellmore, NY; cat. no. N10PS)。

(7) [甲基[①]-^{3}H] 胸腺嘧啶脱氧核苷 1 mCi, 40～60Ci/mmol (Amersham Biosciences, Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, UK; cat. no. TRK418)。

(8) Dulbecco 磷酸盐缓冲盐溶液，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}，无菌 (Cambrexe, Walkersville, MD; cat. no. 17-515Q)。

2.3 切片制备辅助材料

(1) 剪刀一把 (Biomedical Research Instruments, Rockville, MD; cat. no. 25-1050)。

(2) 全弧度眼用敷料镊一副 (Miltex, Bethpage, NY; cat. no. 18-784)。

(3) 索引卡片。

(4) 组织暗盒 (Fisher, Suwanee, GA; cat. no. 15-182-500F)。

(5) 10%甲醛 (Fisher, Suwanee, GA; cat. no. SF98-4)。

(6) 70%乙醇。

(7) 95%乙醇。

(8) 100%乙醇。

(9) 脱毛发剂 (当地药房购买)

2.4 放射自显影材料

(1) 加湿器。

(2) 湿度测量器。

(3) 温度计。

(4) 玻璃搅拌棒。

(5) 塑料药勺。

(6) 孔径为 1 in (2.54 cm) 的塑料涂层试管架。

(7) 柯达 NTB-2 型核示踪感光乳剂 (Eastman Kodak, Rochester, NY; cat. no. 165-4433)。

---

① 此处“甲基”表明^{3}H 的位置，为避免行文冗余，其他处的“甲基”均已省略。——译者注

(8) 黑色的不透光干燥盒。

(9) 柯达 Dektol 显影剂与蒸馏水按 1∶1 的比例稀释，用前制作并过滤（Eastman Kodak，Rochester，NY，cat. no. 146-4700）。

(10) 柯达定影剂（Eastman Kodak，Rochester，NY；cat. no. 197-1746）。

(11) 蒸馏水。

(12) 100%乙醇。

(13) 二甲苯。

(14) 封固剂（Permount；Fisher，Fisher，Suwanee，GA；cat. no. SP15-100）。

(15) 酸性乙醇：1 L 70%乙醇和 10 ml 浓 HCl 混合而成。

(16) 磷酸盐缓冲盐溶液（PBS；用来中和酸性乙醇；Cambrex，Walkersville，MD；cat. no. 17-515Q）。

3 方法

3.1 标记小鼠

(1) 在小鼠分娩之前，为其提供从畜牧业公司获得的饲养器材，这能提高幼鼠的成活率。一旦幼鼠出生，要避免与其接触，一直持续到注射标记物的那一天。

(2) 用 26 号针头配制 [^{3}H] -胸腺嘧啶脱氧核苷注射液，用 5 ml 注射器吸取 4 ml 无菌 PBS，注射到 [^{3}H] -胸腺嘧啶脱氧核苷的试剂瓶中，其最终浓度为 10μCi/50μl。

(3) 出生后第三天，分隔幼鼠并利用 CO_2 吸入法处死所有雄性幼鼠。在注射标记物之前，用幼鼠接触过的褥垫揉搓所戴的新手套，然后再用此手套来握持幼鼠，避免对其产生刺激。将所有雌性幼鼠置于无菌纱垫上。用带有 30 号针头的 1 ml 注射器皮下注射 50 μl [^{3}H] -胸腺嘧啶脱氧核苷/PBS 溶液，注射部位为颈背部 [见注意事项 (1)]。每天上午 9 点和下午 5 点各注射一次，连续注射三天。每只小鼠总共注射 60 μCi 的 [^{3}H] -胸腺嘧啶脱氧核苷。为了保证幼鼠的存活率，每注射完一窝幼鼠后需要更换手套。

(4) 注射结束后，将所有标记的幼鼠连同母鼠一起转移至一次性笼中饲养一周。一周后这些小鼠可以置于常规饲养笼中喂养。

(5) 幼鼠出生后 3～4 周断乳。此时可用 CO_2 吸入法处死所有的母鼠和剩余的雄性幼鼠。

3.2 切片制作

(1) 8 周龄时，所有小鼠吸入 CO_2 后用颈脱位法处死。用电动理发器剪剔净背部毛发，然后在剪毛区涂抹大量的脱毛发剂。不能对脱毛发剂进行刷洗，以免破坏皮肤表皮层。让脱毛发剂保留 2min 后，用冷自来水冲洗干净。

(2) 用镊子和剪刀剪下无毛的光滑皮肤，将其修剪为 2 cm×1.5 cm 大小的矩形，且矩形的长轴要与小鼠身体的长轴一致。将皮肤在索引卡片上铺展开，索引卡片放置于编号的组织暗盒中，然后将暗盒置于 10%甲醛溶液中。

(3) 让组织在10%甲醛溶液中固定，至少过夜。

(4) 将10%甲醛溶液倒入甲醛废液容器中，然后用70%、95%和100%的乙醇对组织进行梯度脱水各30 min。

(5) 从索引卡片上移去组织，将其剪为两个矩形条（1.5 cm×1 cm）并保持长轴不变。

3.3 用液体感光乳胶进行放射自显影（图8.1）

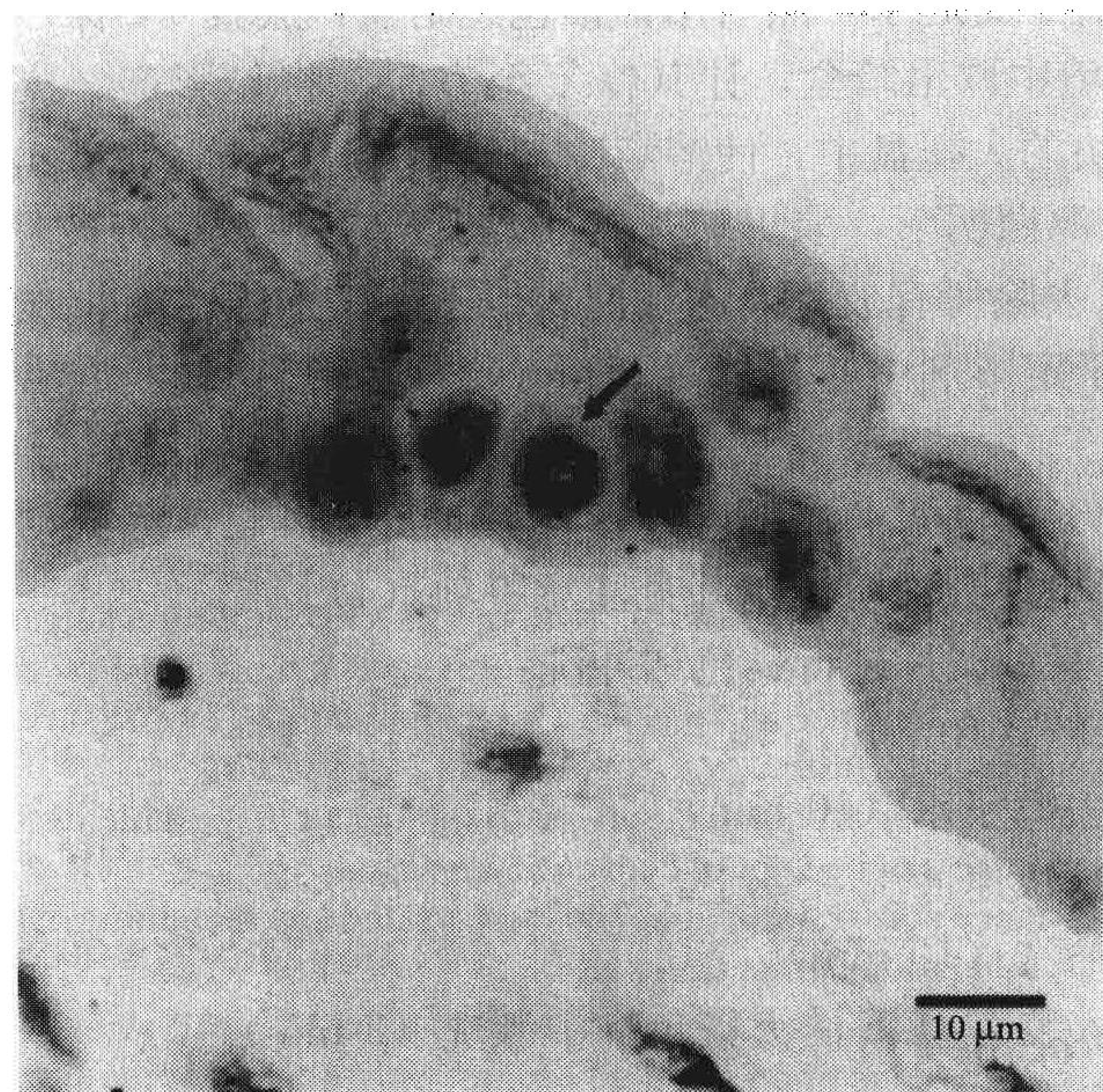


图8.1 标记滞留小鼠皮肤的放射自显影显微照片

图中稍黑的区域为表皮层，这由角蛋白纤维着色所致。箭头所指银颗粒为［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷滞留的角质形成细胞的细胞核。

(1) 在开始操作之前，检测室内的温度和湿度。如果湿度低于50%，需用加湿器［见注意事项（2）］。

(2) 按一系列清洗步骤对切片脱蜡［见注意事项（3）］：

a. 二甲苯 I 3～5 min。

b. 二甲苯 II 3～5 min。

c. 二甲苯 III 3～5 min。

d. 100%乙醇 3 min。

e. 100%乙醇 3 min。

f. 100%乙醇 3 min。

(3) 在水浴中给盛水烧杯加热至41℃。在浸渍用的塑料管中装满一半的蒸馏水。

(4) 打开乳胶包装，用药匙弄碎乳胶。小心将其加入塑料管中，直至离管口约0.5 in（1.27 cm）。

(5) 将盛有乳胶和蒸馏水的塑料管放入水浴的烧杯中，然后不断轻柔搅拌烧杯中的乳胶和蒸馏水混合物 10 min。

(6) 将 12 块空白玻片浸入乳胶中直到玻片上没有气泡形成，缓慢地将实验玻片浸入玻璃罐中。取出玻片后在湿纸巾上蘸去多余的乳胶。

(7) 将玻片斜靠在试管架上，并继续将余下的玻片浸入乳胶中。

(8) 将试管架置于不透光盒中 1～3 h，干燥玻片。

(9) 将已干燥的玻片置于黑色暗盒或不透光盒中。要保证没有光线穿透盒子，可以用黑色照相胶带将盒子封起来，然后用铝箔包裹暗盒，放置 4℃保存 28 d。

(10) 从 4℃环境中取出暗盒，让其恢复至室温。将显影剂、蒸馏水和定影剂溶液置于一个盛有碎冰块的大托盘中，使溶液冷却至 18℃，约需 30 min。

(11) 在安全光源照明下，取出玻片置于玻片架上，然后将玻片架置于显影剂中 3 min。轻敲玻片架以去除所有玻片上的气泡，但不能激烈振荡。将玻片架取出置于蒸馏水中 10 s，然后置于定影剂中，先静置 3 min，再搅拌 3 min。最后将玻片架置于蒸馏水中 3 min。

(12) 将玻片置于染色架上，再放入盛有水的新广口瓶，用流动的冷反渗透水冲洗至少 1 h。也可选择更换数次蒸馏水 [见注意事项 (4)]。

(13) 按下列步骤对玻片进行染色和冲洗：

a. Ehrlich 苏木精 (10 min)。

b. 缓慢流动的去离子水 (10 min)。

c. 50%酸性乙醇快速冲洗 5～6 次。

d. 自来水缓慢冲洗 (10 min)。

e. 将载玻片放入装有 PBS 的大染色缸中漂洗 (3 min)。

f. 自来水缓慢清洗 (10 min)。

g. 70%乙醇 (10 min)。

h. 稀乙醇伊红染色 (30 s)。

i. 95%乙醇脱水 (5 min×2 次)。

j. 100%乙醇脱水 (5 min×3 次)。

k. 二甲苯脱水 (5 min×3 次)。

(14) 用 Permount 或其他中性封固剂和盖玻片封片。

4 注意事项

(1) 给小鼠注射 [^{3}H] -胸腺嘧啶脱氧核苷/PBS 溶液时，会在皮下出现一个隆起。拔除针头时要缓慢，以避免溶液从入针处流出。

(2) 要获得良好的放射自显影结果必须具备合适的温度、湿度、小心混匀及干净清洁等条件。最好配备一个专门用于放射自显影的暗室。

(3) 在购买放射自显影相关试剂时，最好购买 ACS 或相当等级的试剂，组织学用的或工业级的试剂往往含有破坏放射自显影效果的杂质。

(4) 放射自显影出现的问题及可能原因见表 8.1。

表 8.1　放射自显影出现的问题和可能原因

问题	可能原因
高背景	漏光
	低湿度（低于 50%）
	显影剂和定影剂温度太高
	存在化学粉尘
气泡	乳胶搅拌得太快
	空白玻片没有完全浸入乳胶中
染色不均	乳胶未完全混匀
玻片边缘出现黑点	试管架不干净或者没有用塑料包被
玻片底部出现黑点	玻片干燥前没有将水沥干
	忘记将试管架上的纸巾浸湿
部分或所有玻片曝光（出现黑色区域）	暗盒有裂口
	暗盒关闭不严
	胶带封闭不好
横跨玻片的黑色乳胶条纹	乳胶中的气泡顺玻片下滑留下的痕迹

（林　恒 译　彭代智 校）

参 考 文 献

[1] Bickenbach, J. (1981) Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J. Dent. Res.* **60**, 1611—1620.

[2] Morris, R. J. (2000) Keratinocyte stem cells: targets for cutaneous carcinogens. *J. Clin. Invest.* **106**, 3—8.

第 9 章　体外形成克隆的小鼠角质形成干细胞的收集和检测方法

Wei-Yang Wu, Rebecca J. Morris

摘　要：成年小鼠的原代角质形成细胞可从 6～8 周龄小鼠的背部皮肤获取。给小鼠实施安乐死后，剪去背部的毛发，用聚维酮碘及乙醇溶液多次清洗消毒皮肤。切取小鼠背部皮肤，用胰蛋白酶处理，再将表皮与真皮分离。这一已证实的方法所收集的细胞可用于分子生物学、生物化学及各种细胞培养技术，包括本章所介绍的克隆形成细胞检测。
关键词：角质形成细胞；收集；原代；小鼠；细胞培养；皮肤

1　导言

皮肤是机体最大的器官之一，发挥多种作用，包括保护、体温调节和水分保持。在过去的 50 多年里，对小鼠皮肤的研究已经获得许多有关皮肤结构、功能及致癌机制的新信息。由于小鼠在毛囊生长及致癌实验研究方面应用广泛，因此常常需要将成年小鼠分离和培养原代表皮角质形成细胞与体内的研究相结合。除了我们所描述的克隆形成角质形成细胞检测法外，本章还介绍了从成年小鼠收集原代角质形成细胞的操作步骤，该方法已得到良好的证明且非常成功[1～4]。

2　材料

2.1　小鼠

准备 6～8 周龄的成年雌性小鼠 4 或 5 只。超过 8 周龄的小鼠将进入毛发生长初期，制备的细胞活力就会下降。此外，如果小鼠处于毛发生长周期的初期，则对其表皮进行胰蛋白酶消化会更加困难。现已针对雌性小鼠皮肤较薄的特点优化了角质形成细胞的收集步骤。

2.2　成纤维细胞

Swiss 小鼠 3T3 成纤维细胞（ATCC，Rockville，MD；cat. no. CCL-92）可从 ATCC 获得。

2.3　收集器械

（1）500 ml 的 Nalgene 缸用于冲洗小鼠（Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 11-815-9E）。

(2) 10%聚维酮碘手术用溶液（Purdue Frederick Co.，Stamford，CT；cat. no. NDC0034-2100-87）（大约 150 ml）。

(3) 蒸馏水或 Milli-Q 的去离子水（我们用新鲜的双蒸反渗水）。

(4) 70%乙醇。

(5) 高压蒸汽灭菌的收集器械，置于盛有 70%乙醇的烧杯内。

(6) 一把剪刀（Biomedical Research Instruments，Rockville，MD；cat. no. 25-1050）。

(7) 一副全弯型眼用敷料镊（Miltex，Bethpage，NY；cat. no. 18-784）。

(8) 一副按捏换药镊（Miltex，Bethpage，NY；cat. no. 6-4）。

(9) 4 号手术刀柄（Biomedical Research Instruments，Rockville，MD；cat. no. 26-1200）。

(10) 22 号无菌不锈钢刀片（Biomedical Research Instruments，Rockville，MD；cat. no. 27-1330）。

(11) 无菌样本杯（Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 14-375-147）。

(12) 薄的 100 mm×10 mm 的无菌塑料有盖培养皿（Fisher，Suwanee，GA；cat. no 08-747B）。

(13) 无菌圆锥形试管（50 ml，Falcon，Franklin Lakes，NJ；cat. no. 352068）。

(14) 一次性吸管（5 ml 和 10 ml，Falcon，Franklin Lakes，NJ；cat. no. 5-ml pipet 357543；10-ml pipet 357551）。

(15) 方形的无菌塑料有盖培养皿（Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 08-757-11A）。

(16) 微量离心管（Sarstedt，Newton，NC；cat. no. 72.608）。

(17) 玻璃漏斗（Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 10-384B）。

(18) 直径 90 mm 筛网，孔径 70 μm（Spectra-Mesh F；Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 08-670-198）。

(19) 带有轴心环的 1.5 in（3.7 cm）搅拌子（Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 09-312-575）的 Nalgene 缸（60 ml，Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 11-815-10B）。

(20) 100 mm×15 mm 的无菌塑料有盖培养皿（Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 08-757-12）。

(21) 70 μm 特富龙筛网（Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 09-901C）。

(22) 带 40 号刀片的小动物电动理发剪［Oster Golden A5；Miltex，Bethpage，NY；cat. no. 51-1000（夹子），51-1340（刀片）］。

(23) 细胞冷冻盒（Nalgene “Mr. Frosty”；Fisher，Suwanee，GA；cat. no. 15-350-50）。

2.4 培养器材

(1) 150 cm^2（T-150）培养瓶（Corning，Corning，NY；cat. no. 430825）。

(2) 35 mm 无菌培养皿（Corning，Corning，NY；cat. no. 430165）。

(3) 60 mm 无菌培养皿（Corning，Corning，NY；cat. no. 430166）。

2.5 溶液

(1) Dulbecco 磷酸盐缓冲盐溶液，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}，无菌（Cambrex Biosciences，Walkersville，MD；cat. no. 17-515Q）。

(2) 0.25%胰蛋白酶溶液（Gibco，Rockville，MD；cat. no. 15050-057）。

(3) 0.4%台盼蓝生理盐水（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. T-8154）。

(4) 青霉素-链霉素溶液（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. P4333）。

(5) SMEM：用于悬浮培养的无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的最低必需培养基（Gibco，Grand Island，NY；cat. no. 11380-037）。

(6) 胎牛血清（FBS；Hyclone，Logan，UT；SH 30070.03）。

(7) 庆大霉素（Cambrex，Walkersville，MD；cat. no. 17-518 L）。

(8) 纤维结合蛋白（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. F-1141）。

(9) 牛血清白蛋白（BD Biosciences，Bedford，MA；cat. no. 354331）。

(10) 胶原（Vitrogen；Cohesion，Palo Alto，CA；cat. no. PC 0701）。

(11) 1 mol/L HEPES（Cambrex，Walkersville，MD；cat. no. 17-737E）。

(12) 二甲基亚砜（DMSO；Sigma，St. Louis，MO；cat. no. D 2650）。

(13) 小牛血清（BCS）（Hyclone，Logan，UT；cat. no. SH 30073.03）。

(14) William E 培养基（Gibco，Rockville，MD；cat. no. 125510-032）。

(15) Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（DMEM；Gibco，Rockville，MD；cat. no. 12100-061）。

2.5.1 收集用的溶液

(1) 含 2×庆大霉素的 PBS：500 ml Dulbecco 磷酸盐缓冲盐溶液和 2 ml 庆大霉素。

(2) 胰蛋白酶溶液：含 2×庆大霉素的 PBS（45 ml）和 2.5%胰蛋白酶（5 ml）。

2.5.2 细胞培养的溶液

(1) 胶原-纤维结合蛋白平皿包被液：细胞培养液（100 ml）；纤维结合蛋白（1 mg）；1.0 mg/ml 冻存的牛血清白蛋白储存液（10 ml）；胶原（1 ml）；1 mol/L HEPES（1 ml）；116 mmol/L $CaCl_2$（1 ml）。

(2) DMSO-DMEM 细胞冻存液：DMSO（2 ml）加入到含 10%小牛血清和青霉素-链霉素的 DMEM（18 ml）中配制而成。

2.5.3 培养基

(1) “收集”培养基：SMEM（500 ml）、FBS（50 ml）和庆大霉素（2 ml）。

(2) 用于大量培养的培养基是含下列添加剂配方的一种高钙 Williams E 培养基(表 9.1)。

表 9.1 William's E 培养基的添加剂

储存液	来源[a]	配方
表皮生长因子	B #354001	100 μg/20 ml 水
谷氨酰胺	C #17-605B	分装成每份 14.5 ml
氢化可的松	B #354203	50 mg/50 ml 乙醇
胰岛素	S #I1882	200 mg/80 ml 水
亚油酸-牛血清白蛋白	B #354227	2.5 mg 亚油酸/500 mg 牛血清白蛋白/25 ml 水
转铁蛋白	S #T1147	1 g/200 ml 水
维生素 A（视黄醇乙酸酯）	S #R0635	1 mg/1 ml 乙醇
维生素 D_2	S #E8014	10 mg/1 ml 乙醇
配成 500 ml 培养基，加：		
表皮生长因子	1 ml	
谷氨酰胺	14.5 ml	
氢化可的松	0.5 ml	
胰岛素	1 ml	
亚油酸-牛血清蛋白	0.5 ml	
转铁蛋白	1 ml	
维生素 A（视黄醇乙酸酯）	57.5 μl	
维生素 D_2	50 μl	
青霉素-链霉素	5 ml	
胎牛血清	100 ml	

a. 来源一栏中所用的缩略词是：S，Sigma（St. Louis，MO）；B，BD Biosciences（Bedford，MA）；C，Cambrex（Walkersville，MD）。

（3）DMEM（用于 5% CO_2 培养箱中所用的配方）：

a. 加 8 L 蒸馏水到大的培养瓶内。

b. 放入搅拌子，置于磁力搅拌器上，在搅拌的同时加入 DMEM 粉。

c. 用蒸馏水清洗 DMEM 空瓶，倒入上述培养瓶内。

d. 用 25 ml 吸管搅拌以助粉剂的溶解。

e. 称取 22 g NaCl 和 2 g $NaHCO_3$ 加到培养瓶内。

f. 加 2 L 蒸馏水至终容量为 10 L。

g. 调 pH 至 7.2～7.4。

h. 用 0.22 μm 滤器除菌过滤，在 1 L 培养瓶内加至 900 ml 的标记线上。

（4）3T3 成纤维细胞培养基：900 ml DMEM；100 ml BCS 和 10 ml 青霉素-链霉素。

3 方法

3.1 3T3 饲养细胞层

3.1.1 细胞培养的开始

（1）从－80℃冰箱或液氮罐中取出一支 3T3 细胞的冻存管，放在 37℃水浴中 1～2

min 迅速解冻，待冰完全溶化时移出冻存管。在生物安全柜或层流通风橱内，用 70% 乙醇拭子擦洗冻存管，非常轻柔地用 1 ml 吸管吹吸细胞三次。将整个冻存物吸取至一个 T-150 型培养瓶中，再用 1 ml 培养液清洗冻存管。慢慢加入 30 ml 温热的 DMEM，轻柔地摇动培养瓶使细胞均匀分布。在瓶上标记日期及细胞的传代数目。在 5% CO_2、100%湿化的空气、37℃培养。

(2) 24 h 后更换培养液以除去死细胞及 DMSO 冷冻保存剂。一周换液两次。细胞只允许增殖至铺满 80%。

3.1.2 传代培养

(1) 从培养箱内取出培养瓶，用不含庆大霉素的冷 PBS 洗两次，每个 T-150 培养瓶内加 10 ml 37℃水浴预温的胰蛋白酶液。将培养瓶置于培养箱内温育 3～5 min，取出培养瓶，轻轻地拍打瓶的侧面以使黏附的细胞松动。在倒置显微镜下确认细胞已从瓶底分离。混有悬浮细胞的胰蛋白酶液应该是混浊的。

(2) 吸取培养液冲洗培养瓶的细胞生长表面 5 次。吸出瓶中所有内容物，加到盛有 30 ml DMEM 的 50 ml 圆锥形试管内。取出 10 ml 此 DMEM 混悬液，再次冲洗培养瓶的细胞生长表面 5 次。两个 T-150 培养瓶内容物可放置于一个 50 ml 的圆锥形试管内。

(3) 4℃ 160 *g* 离心 7 min。

(4) 吸弃上清液，加入 5 ml DMEM 液，轻轻吹散 10 次以重悬细胞沉淀。再加 25 ml 培养液达到总体积为 30 ml。再吹打 10 次以混匀细胞，每次吸出 5 ml 细胞悬液分别加入 6 个 T-150 培养瓶内。传代培养的比率为 1∶3。

(5) 在培养瓶上标记日期及细胞的传代次数。

3.1.3 3T3 细胞的冻存

(1) 按照 3T3 细胞传代的方法进行直到步骤 (3)。

(2) 从离心机上取出试管，置于冰上。吸弃上清，每个 T-150 培养瓶收获的细胞沉淀用 1 ml DMSO-DMEM 细胞冻存液重悬。

(3) 每个冻存管加 1 ml 细胞悬液。在冻存管上标记细胞传代次数、细胞系 (3T3) 及冻存的日期。

(4) 将冻存管放于 Nalgene 细胞冷冻盒，置－70℃冰箱 5h 以上。取出冻存管，置于液氮罐内冻存。

3.1.4 3T3 饲养细胞层的照射与接种

(1) 细胞照射前 1 周，让培养瓶内细胞长至 100%铺满。所用细胞通常是 120～130 代之间。

(2) 培养瓶内细胞用 137-铯以 5000 rad 的辐射吸收剂量照射。带培养液的培养瓶可一起照射。根据机器不同，这一过程约需 1 h。

(3) 照射后，吸弃培养液，细胞用含庆大霉素的冷 PBS 洗两次，每个 T-150 培养瓶内加 10 ml 37℃水浴预温的胰蛋白酶液，置培养瓶于培养箱内温育 3～5 min。取出培养瓶，轻轻地拍打瓶的两侧以使黏附的细胞松动，在倒置显微镜下确认细胞从瓶底分

离。混有悬浮细胞的胰蛋白酶液应是混浊的。

（4）吸取溶液，冲洗培养瓶的细胞生长表面5次。吸取所有清洗液，加入到盛有30 ml DMEM的50 ml圆锥形试管内。取此DMEM混悬液10 ml，再次清洗培养瓶的细胞生长表面5次，两个T-150培养瓶内容物可放置于一个50 ml的圆锥形的试管内。

（5）4℃ 160 *g* 离心7 min。

（6）吸弃上清液，加入5 ml DMEM液，轻轻吹散10次以重悬细胞沉淀。加25 ml培养液达到总体积为30 ml。再吹吸10次以混匀细胞，取出约0.5 ml细胞悬液移入无菌的小试管内。另取200 μl这种细胞悬液与0.4%台盼蓝溶液200 μl混合。轻轻吹吸细胞混合液3次，将细胞加入血细胞计数器，计数所有有核细胞。凡是黑色或蓝色的细胞可认为是死细胞，而小的晶莹透亮的细胞可判断是活细胞。

（7）计数细胞数量及细胞浓度，吸取7×10^5个细胞于60 mm的有盖培养皿中。细胞贴壁24 h后再接种原代角质形成细胞。

3.2 角质形成细胞的收集与接种

（1）将4或5只小鼠吸入CO_2 1.5 min实施安乐死后，再予以颈椎脱位［见注意事项（1）］。用电动的动物推剪在背部剪除15～18 cm^2的毛发，将小鼠放入有足够聚维酮碘溶液的缸内并加盖。摇动缸子以使溶液均匀分布在小鼠身上。倒掉溶液，用蒸馏水或Milli-Q去离子水洗净，再分别用聚维酮碘溶液浸泡和蒸馏水清洗一次，用70%乙醇摇动、漂洗两次，最后一次漂洗后，加入70%乙醇浸没小鼠，并浸泡5～10 min。浅色毛发的小鼠会保持黄色，而深色的小鼠却不能。黄色不会导致细胞活性或培养时的生长能力有任何明显的改变。

（2）在层流通风橱或生物安全柜内，用组织镊与剪刀获取背部皮肤，放在盛有含2×庆大霉素PBS的杯内。不要试图去获取比侧旁更低的皮肤，否则会有不需要的乳房细胞污染收集物。

（3）用组织镊与手术刀切取皮肤，将有毛侧向下朝向有盖培养皿（盖或底均可使用）。将刀片垂直于皮肤用一种快速的方式从皮肤上刮去所有皮下组织，使皮肤呈半透明状而不至于变干。尽量去除所有残留的皮下组织，但刮的力度不要太大，以免撕裂皮肤或将真皮内的毛囊去掉。将皮肤放回PBS中直至所有的皮肤均处理完毕。

（4）取一片皮肤放置在平皿上，将有毛的一面朝上铺展开。顺长边将皮肤切成两半，再切成0.5 cm×（1～1.5）cm的小条。

（5）将15～25 ml无菌胰蛋白酶液倒入有盖培养皿中，用镊子使皮肤有毛的一面漂浮在胰蛋白酶液的表面。把培养皿置于32℃孵箱内2 h［见注意事项（2）］。在孵育期间，用胶原-纤维结合蛋白包被液包被培养皿，置于37℃孵育1 h［见注意事项（3）］。到指定的时间后，吸弃剩余包被液，培养皿不必晾干。

（6）准备一个正方形的有盖培养皿，加入10 ml SMEM，并用一个微量离心管盖子将培养皿盖以一定角度撑起。用镊子取出条形皮肤，再用新手术刀片将表皮刮进培养液。刮表皮时需要特别注意［见注意事项（4）］，要用足够的力量，但不要过量，否则会导致细胞活力降低。丢弃真皮或者保留它用于切片证实毛囊与表皮一起已完全移去。

（7）小心地将带表皮的培养液倒入放有1.5 in（3.7 cm）搅拌子的60 ml无菌Nal-

gene 瓶内。再添加培养液清洗有盖培养皿，将洗液加入试管内使最终体积为 30 ml，用螺口帽盖住，室温下用磁力搅拌器以 100 r/min 的速度搅拌 20 min。

(8) 将 70μm 孔径的无菌聚四氟乙烯树脂筛网放在一无菌漏斗内，下置 50 ml 的锥形试管。将瓶内容物倒入筛网中滤除毛发和角质片层，用弯镊挤压毛发和筛网内的残留物质以使留滞网上的细胞流入试管。用 5 ml SMEM 清洗瓶子，倒入筛网，重复一次以去除瓶内剩下的细胞。盖上试管，4℃ 160 *g* 离心 10 min。如果需要，可将筛网内的残留物质做进一步的组织学分析。筛网可先用温水和液性氮氧化物或其他组织培养清洁剂清洗，再用蒸馏水彻底漂洗后可反复使用。

(9) 吸弃上清，加 5 ml 冷藏的 SMEM，用 5 ml 的吸管反复吹吸 20～25 次以混匀重悬细胞，并确保细胞在 4℃以防止细胞聚集。再加 25 ml SMEM，用 5 ml 的吸管反复吹吸 20～25 次。吸取 1 ml 细胞悬液加 19 ml 的 SMEM 做 1∶20 的细胞悬液稀释，用 5 ml 吸管反复吹吸 20～25 次以混匀。这样稀释以确保准确的细胞计数。

(10) 吸取 0.5 ml 1∶20 稀释的细胞悬液，置于一个小的无菌试管内。吸 200 μl 细胞悬液与 0.4% 等量的台盼蓝溶液混合，轻柔吹吸三次。将细胞加入血细胞计数器，对所有有核细胞计数。所有深色或蓝色或大而亮的细胞可判断为死细胞，而小的晶莹透亮的可认为是活细胞。每个小鼠可收集的细胞数范围为 (2.0～2.5)×10^7 个。

(11) 将最初的细胞悬液试管 1000 r/min 离心 10 min，用 5 ml 培养液重悬细胞。对细胞进行合适的稀释后接种。对于大量培养来说，常以每个 35 mm 培养皿接种 4×10^6 个活细胞，或每平方厘米接种 (1.5～1.9)×10^5 个活细胞。每个 60 mm 培养皿接种 1×10^3 个活细胞可用于克隆形成细胞的检测 [见注意事项 (5)]。在 35 mm、60 mm 的培养皿中分别加入 2 ml 或 4 ml 培养液。

(12) 在 32℃、5%CO_2 和 100%湿化的孵箱内培养细胞。接种后次日换液，以后大量培养，每周换液三次。对于克隆培养，第一次换液是在初次接种后两天，此后每周换液三次。

(13) 经过 2 周和 4 周的培养都可见到代表性的克隆培养物 (图 9.1)。在这些时间

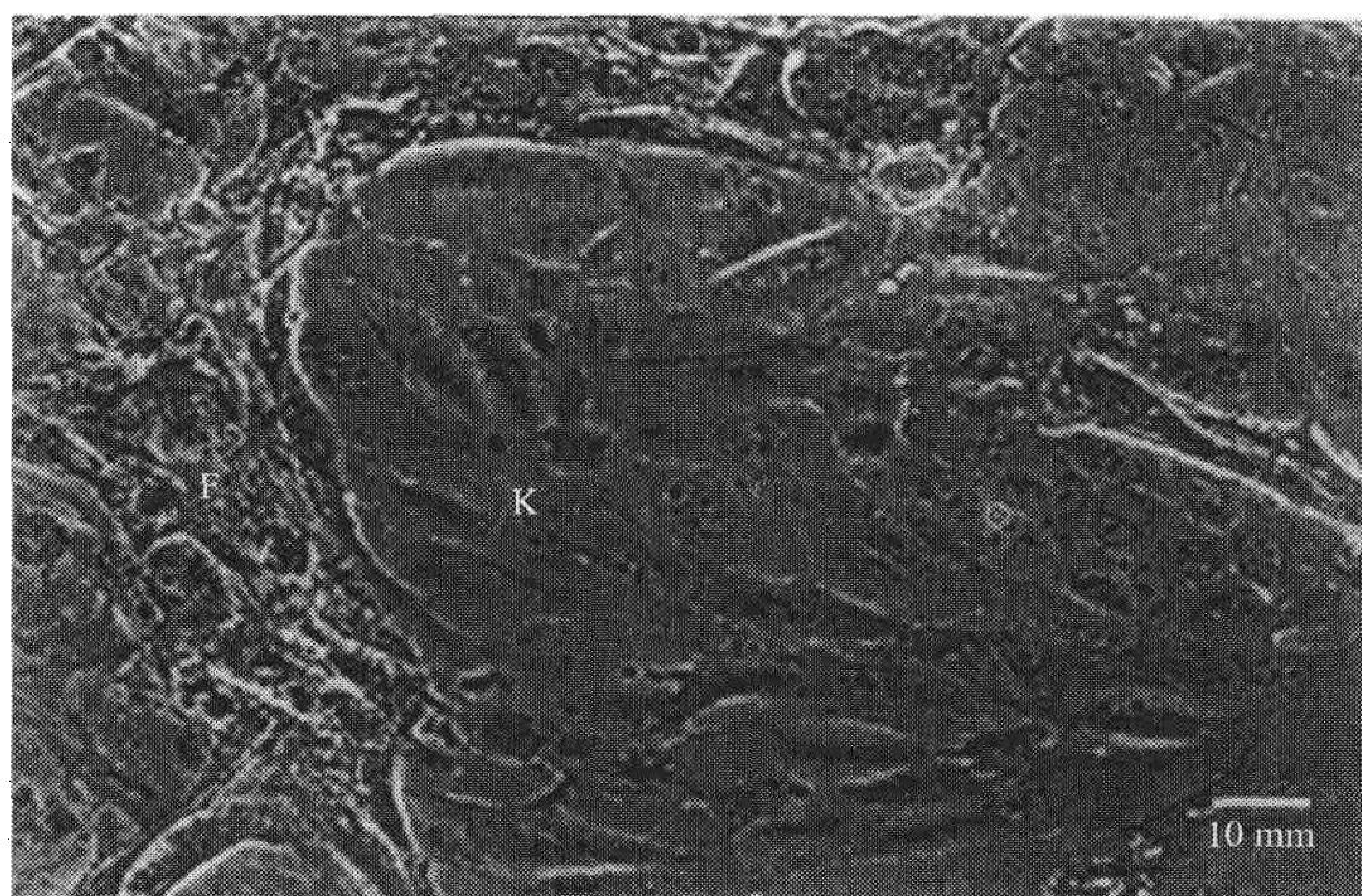


图 9.1 生长在辐照后 3T3 成纤维细胞层上的角质形成细胞的克隆显微照片

角质形成细胞克隆用 K 标记。围绕稠密细胞层生长的成纤维样细胞是 3T3 成纤维细胞饲养层，标示为 F。

点，吸弃培养液，细胞用10%甲醛固定过夜。固定后，细胞用0.5%罗丹明B水溶液染色3 min。去除染液后培养皿用冷自来水冲洗10 s，晾干后，进行集落计数（图9.2）。

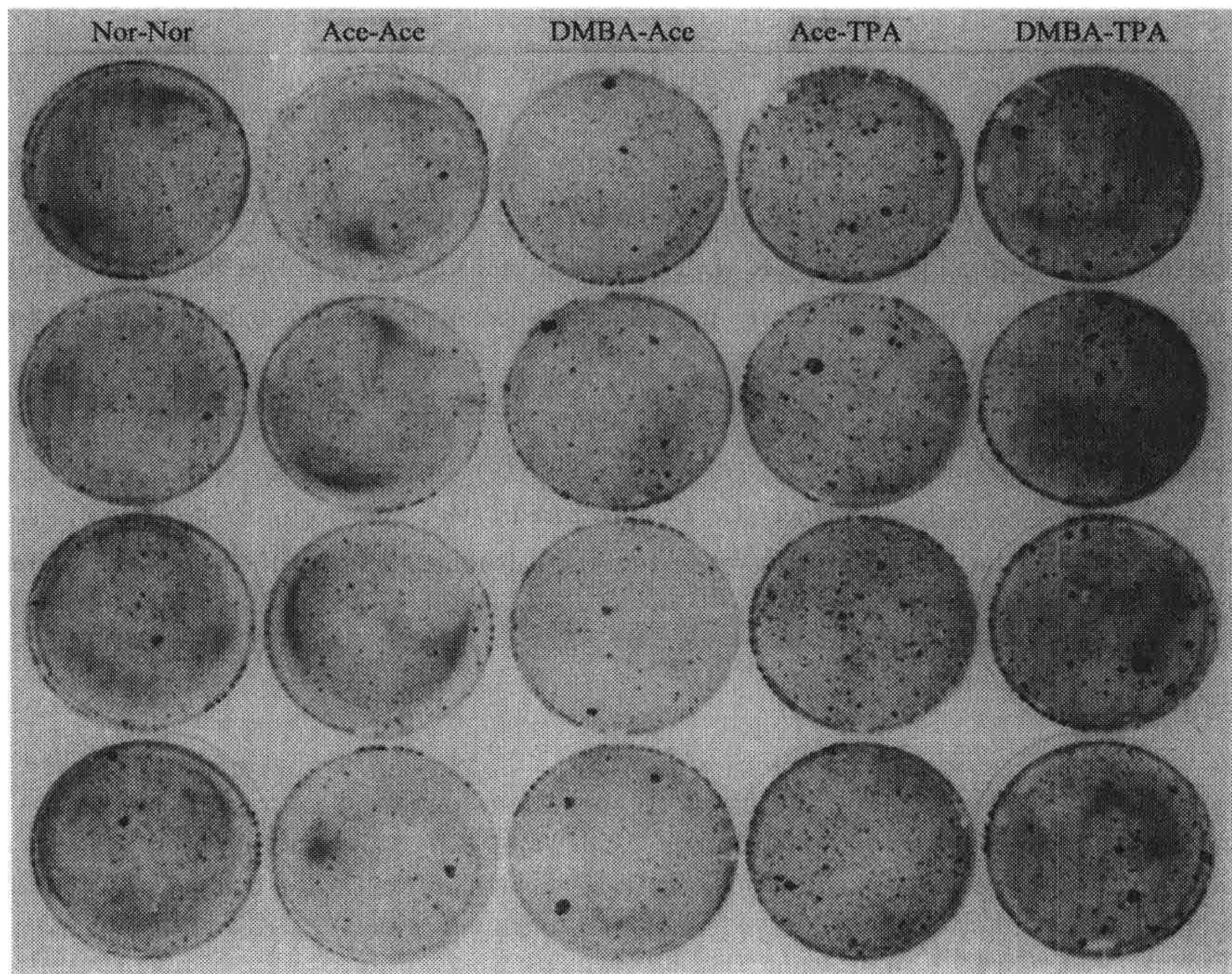


图9.2 不同处理后小鼠角质形成细胞的集落性生长

用0.5%罗丹明B对60 mm培养皿3T3饲养细胞层上生长的角质形成细胞克隆进行染色。Nor-Nor，正常（Nor）对照；Ace-Ace，丙酮（Ace）处理后24 h再用丙酮处理第二次；DMBA-Ace，7，12-二甲基苯并蒽（DMBA）处理后24 h再用丙酮处理；Ace-TPA，丙酮处理后24 h再用12-*O*-十四烷酰佛波醋酸酯-13（TPA）处理；DMBA-TPA，DMBA处理后24 h时再用TPA处理。

4 注意事项

（1）所述步骤也可用于一只小鼠。该步骤的唯一改变是细胞悬液的最终稀释度。细胞悬液用6 ml进行稀释，而不是30 ml。

（2）胰蛋白酶消化的时间和温度是获得细胞产量高且可培养活性优良的关键所在。尽管其他方法可提供良好的活细胞收获量，但就我们的经验来说，其所得角质形成细胞的可培养能力不太令人满意。

（3）培养板的包被对于成年小鼠表皮细胞的贴壁、伸展和最终生长非常重要。

（4）在表皮擦刮步骤中，必须保持刀片垂直于皮肤。如果刀片朝运动的方向成角，可能会发生组织的撕裂；如果刀片朝背离运动的方向成角，那么就不足以有效地移去表皮。

（5）当进行克隆定量检测时，我们已经发现吸取细胞悬液不少于1 ml是有益的。这样，如果细胞在最初20 ml稀释液［见3.2步骤（10）］稀释时的浓度很高，就必须

对细胞悬液进行一系列稀释后才能用做克隆定量。

（王　勇译　彭代智校）

参考文献

[1] Morris, R. J., Fischer, S. M., and Slanga, T. J. (1986) Evidence that a slowly cycling subpopulation of adult murine epidermal cells retains carcinogen. *Cancer Res*. **46**, 3061—3066.

[2] Baer-Dubowska, W., Morris R. J., Gill, R. D., and DiGiovanni, J. (1990) Distribution of covalent DNA adducts in mouse epidermal subpopulations after topical application of benzo (a) pyrene and 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene. *Cancer Res*. **50**, 3048—3054.

[3] Tani, H., Morris, R. J., and Kaur, P. (2000) Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **97**, 10, 960—10, 965.

[4] Trempus, C. S., Morris, R. J., Bortner, C. D., Cotsarelis, G., Faircloth, R. S., Reece, J. M., et al. (2003) Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 501—511.

第 10 章　人角质形成干细胞的 FACS 富集

Amy Li, Pritinder Kaur

摘　要：本实验室的最近工作已经建立和确认了以荧光激活细胞分选术（fluorescence-activated cell sorting，FACS）为基础的前瞻性分离技术，可以从人和小鼠皮肤组织中分离出具有活性的角质形成干细胞。本文叙述了采用该技术从皮肤组织分离表皮角质形成细胞、对其细胞表面标记进行免疫荧光染色，以及提供给 FACS 以得到干细胞、短暂扩充细胞、早期分化细胞等角质形成细胞组分的详细步骤和方法。这些分选出来的活细胞可以在培养后进行深入的分析或者直接用于角质形成细胞的检测，如器官型培养或体内移植等。本方法将有助于在创面愈合、致癌作用和治疗方法等方面全面地研究角质形成祖细胞的生物学特性。

关键词：角质形成干细胞；FACS 分离；免疫荧光标记；表皮；细胞表面标记；角质形成祖细胞；整合素；CD71（转铁蛋白受体）

1　导言

角质形成干细胞（keratinocyte stem cell，KSC）的分离是研究皮肤生物学各个方面的中枢关键，包括组织再生、创面修复、致癌作用和基因治疗手段的研发等。KSC 占皮肤基底细胞的 1%～10%[1～5]，被鉴定为慢周期性的氚标胸苷滞留细胞[2,4,6,7]。角质形成干细胞位于表皮基底层，伴随由它分化而来的周期快、寿命短的短暂扩充（TA）细胞和早期分化细胞，而它们最终分化为终末分化细胞并不断地从皮肤表面脱落[1～3,8～11]。这些细胞动力学研究可以在鼠类皮肤组织的原位检测到 KSC。由于 KSC 缺乏特异性表面标记分子，这就阻碍了活体外人角质形成干细胞的分离与鉴定技术的发展。早期开拓性的研究是利用细胞的增殖能力和子代细胞的分化情况来回顾性地鉴定培养情况下的人 KSC[12]。通过鉴定细胞表面标记来区分不同增殖潜能的基底细胞的一个重要进展就是发现了角质形成细胞表面整合素 β_1 的水平与其集落形成率有关[13,14]。虽然整合素 β_1 的高水平表达被认为可以鉴别 KSC，但后来的研究揭示整合素 β_1 明亮的细胞群体包括大部分的增殖性基底细胞（KSC 和 TA 细胞）和一些分化细胞[15～17]。更为重要的是，本实验室的工作已显示以整合素 α_6 和 CD71 两种细胞表面标记为基础可以从人皮肤组织中分离和鉴定 KSC。尤其是表达高水平整合素 α_6 和低水平 CD71 的基底角质形成细胞（命名为 α_6^{bri}CD71^{dim}）满足干细胞的许多重要标准（包括细胞处于静止状态、出现率低、长期和短期培养都有最大的细胞再生能力、细胞体积小、高核浆比、缺乏细胞分化的标志等[18]），并且在体外器官型培养系统中能生长成正常的完全分层表皮。此外，具有相同细胞表面表型的鼠类基底角质形成细胞可富集到标记滞留干细

胞[19]，从而给体内动力学独特的干细胞群体与细胞表面表型之间提供了第一个直接的联系。本章叙述了以细胞表面表型为基础，采用 FACS 技术分离基底角质形成细胞的重要亚群（角质形成干细胞）、短暂扩充细胞（α_6^{bri}CD71^{bri}）和分化细胞（α_6^{dim}）的方法。此方法可以前瞻性地分离出具有活性的这三类角质形成祖细胞，并用于对其特性的进一步研究。

2 材料

2.1 用于免疫标记的抗体（也可见表 10.1）

（1）小鼠抗人 CD49f 抗体（Serotec；cat. no. MCA956）。

（2）生物素化小鼠抗人 CD71 抗体（PharMingen BD；cat. no. 555535）。

（3）小鼠 IgG2b 同型对照抗体（PharMingen BD；cat. no. 555740）。

（4）生物素化小鼠 IgG2a 同型对照抗体（PharMingen BD；cat. no. 555572）。

（5）山羊抗小鼠 IgG2b-异硫氰酸荧光素抗体（FITC；1∶80；Caltag；cat. no. M32501）。

（6）链亲和素-别藻蓝蛋白［APC；1∶250；PharMingen BD；cat. no. 554067；见注意事项（1）：备选的荧光染料］。

表 10.1 流式细胞分析对照组的设置及免疫荧光标记所用的一抗细胞数

	细胞数	抗体	抗体终浓度	染色体积
空白对照	(1～2)×10^5	N/A[a]	N/A	100 μl
7-氨基放线霉素 D 对照	(1～2)×10^5	N/A	N/A	100 μl
CD49f-FITC 单色对照	(1～2)×10^5	小鼠抗人 CD49f 抗体	10 μg/ml	100 μl
CD71-APC 单色对照	(1～2)×10^5	生物素化小鼠抗人 CD71 抗体	5 μg/ml	100 μl
同型配对对照	(1～2)×10^5	小鼠 IgG2b 同型对照抗体	10 μg/ml	100 μl
		生物素化小鼠 IgG2a 同型对照抗体	5 μg/ml	
样本管	10^6～10^7	小鼠抗人 CD49f 抗体和生物素化小鼠	10 μg/ml	200 μl～
		抗人 CD71 抗体	5 μg/ml	800 μl[b]

a. N/A 表示不适合；b. 根据细胞数调整染色体积。

2.2 实验器材

（1）解剖弯剪，长 115 mm（ProSciTech，Australia；cat. no. T1046）。

（2）细尖弯镊，型号为 7A（ProSciTech，Australia；cat. no. T67A）。

（3）手术刀柄（ProSciTech，Australia；cat. no. T134）和刀片（no. 22；ProSciTech，cat. no. LSB22）。

（4）70 μm 的细胞过滤器（Becton Dickson；cat. no. 352350）。

（5）FACS 专用的聚丙烯圆底管（5 ml，Becton Dickinson；cat. no. 352063）。

（6）带细胞滤管盖的圆底管（5 ml，Becton Dickinson，cat. no. 352235）。

2.3 人皮肤的来源

从经供者或其亲属同意的个体获得人新生儿包皮和乳房成形术或腹壁成形术的成人断层皮肤。

2.4 试剂

除非另有特殊说明，所用试剂均经 0.22μm 的滤器过滤除菌并保存于 4℃。

2.4.1 皮肤标本的处理

（1）RPMI-AF（即含抗真菌剂及抗生素的培养基）：488.5 ml RPMI-1640 培养基，10 ml 青霉素-庆大霉素（用去离子水分别配成 600 μg/ml 和 8 mg/ml），1.5 ml 氟康唑（2 mg/ml 溶液）（Pfizer Pty Ltd，France）。

（2）PBS-AF：488.5 ml 无钙离子和镁离子的 PBS，10 ml 青霉素-庆大霉素（用去离子水分别配成 600 μg/ml 和 8 mg/ml），1.5 ml 氟康唑（2 mg/ml 溶液）（Pfizer Pty Ltd，France）。

（3）中性蛋白酶溶液：中性蛋白酶 II（Neutral dispase II，Roche Diagnostics；cat. no. 165 859），以 PBS-AF 溶液配制，浓度为 4 mg/ml。用前溶于 PBS，并以 0.22μm 的滤器过滤除菌。

2.4.2 从皮肤样本分离角质形成细胞

（1）胰蛋白酶-EDTA：0.05%（*m/V*）的胰蛋白酶和 0.025%（*m/V*）的 EDTA（Trace Biosciences；cat. no. 21-160-0100V）。

（2）胰蛋白酶抑制剂：DMEM（500 ml），0.1 g 牛血清白蛋白（BSA）（组织培养级，Serologicals，GA；cat. no. 82-047-5），0.01 g 大豆胰蛋白酶抑制剂（Sigma；cat. no. T9003）。

（3）台盼蓝溶液：0.4%（Sigma；cat. no. T8154）。

2.4.3 免疫荧光标记

（1）角质形成细胞生长培养基（KGM）：500 ml KBM（Clonetic，CC-3101），5 ml 青霉素-庆大霉素（预先以去离子水分别配成 600 μg/ml 和 8 mg/ml），500 μl 氢化可的松（以无水乙醇配成 500 μg/ml）（Sigma；cat. no. H-0135），500 μl 胰岛素（以 12 mmol/L 的HCl 溶液配成 5 mg/ml）（Sigma；cat. no. I-5500），50 μl 表皮生长因子（以事先经 0.22μm 滤器除菌的含 0.1%BSA 的 10 mmol/L 乙酸溶液配制，浓度为 100 μg/ml）（Sigma；cat. no. E-4127），1 ml 牛脑垂体提取物（35 mg/ml）（Hammond Cell Tech；cat. no. 1077）。

氢化可的松 4℃避光保存于密封瓶中。重新溶解配制的表皮生长因子，保存于－80℃。其他所有添加剂配制后均以 0.22μm 滤器除菌，分装保存于－20℃。

（2）封闭缓冲液：49 ml KGM，1 g BSA，1 ml 胎牛血清（CSL Biosciences）。

（3）标记及洗涤缓冲液：500 ml KGM，5 g BSA。

（4）7-氨基放线霉素 D（7-AAD）（Sigma；cat. no. A9400)：以去离子水配制成 100 μg/ml，分装，避光保存于－20℃。

3 方法

3.1 皮肤样本的处理

此部分介绍用于角质形成细胞分离的皮肤样本处理步骤［也可见注意事项（2)］。

3.1.1 皮肤样本的收集

来自手术的所有皮肤样本应立即浸没于生理盐水或 RPMI-AF 中，保存于 4℃。尽早处理标本，从组织中分离的细胞保存时间不要超过 24 h。

3.1.2 成人皮肤组织的处理

为了提高成人皮肤的细胞获得率，最好用取皮机或手术刀片除去皮肤的所有脂肪组织，使其成为 1～2 mm 厚的皮片。然后将其剪成约 2 cm×3 cm 大小（相当于一个包皮）的皮片，并用 PBS-AF 彻底冲洗。再按照 3.1.3 中的人新生儿包皮操作步骤处理皮片。

3.1.3 人新生儿包皮的处理

在生物安全层流橱中做好下列准备：每个包皮需准备两个 100 mm 的培养皿（盛有约 15 ml 4℃预冷的 PBS-AF)；每两个包皮需准备 1 个 60 mm 的培养皿（盛有 10 ml 的中性蛋白酶溶液)；高压灭菌的器械；装有 70％乙醇的烧杯及装有无菌 PBS-AF 的烧杯。

（1）在盛有 PBS-AF 的培养皿中彻底清洗皮肤。

（2）将皮肤真皮面朝上放于倒置的无菌培养皿盖上。用镊子铺平皮肤，再用小弯剪剪去过多的皮下结缔组织。

（3）以手术刀片刮去皮肤真皮面残留的结缔组织。

（4）在装有 PBS-AF 的第二个培养皿中彻底清洗皮片。

（5）将皮片置于另一个倒置的无菌培养皿盖上，并用一新的手术刀片将皮片切成约 2 mm×2 mm 大小，然后将小皮片转移至中性蛋白酶溶液中。

（6）以封口膜密封培养皿，4℃孵育过夜，中性蛋白酶可使基底膜蛋白裂解，从而分离表皮-真皮连接[20]。$\alpha_6\beta_4$ 整合素在此过程中仍保持完整[21]。

3.2 角质形成细胞的分离

此部分介绍从中性蛋白酶处理过的皮肤样本中分离角质形成细胞的操作步骤。在生物安全层流橱中，做好下列准备：解剖器械；盛有 70％乙醇的烧杯和盛有无菌 PBS-AF 的烧杯用于器械消毒；两个盛有 10 ml 冷 PBS-AF 的 60 mm 培养皿（置于冰上）用于中性蛋白酶处理过的皮肤；无菌塑料移液管；胰蛋白酶抑制剂（置于冰上)。

（1）用 50 ml 聚丙烯试管装入 10 ml 胰蛋白酶-EDTA 消化液，放于 37℃水浴箱中

预热至使用前，可用于每个平皿中经中性蛋白酶处理过的表皮。

（2）将皮片的真皮面朝下放置于倒置的培养皿盖上，以一把镊子按住真皮组织，以另一把镊子轻轻将表皮片撕离下来，并直接将其放于另一已经加有 PBS-AF 的培养皿中。

（3）用塑料移液管小心吸除平皿中的 PBS-AF，然后用镊子收集表皮片并转移至预热的胰蛋白酶-EDTA 试管中。用塑料移液管用力上下吹吸 5 min，并尽量使表皮片进出吸管，让胰蛋白酶充分发挥作用。虽然在此期间基底细胞已从表皮片脱离下来至胰蛋白酶液中，但表皮片保持完整。

（4）加入等体积（10 ml）胰蛋白酶抑制剂终止反应，轻轻混匀，置于冰上。

（5）按照步骤（3）和（4）处理另一些培养皿中的皮肤。

（6）将消化的细胞悬液经 70μm 细胞滤器过滤到 50 ml 试管中，每 20 ml 细胞悬液使用一个细胞滤器。

（7）4℃ 400 *g* 离心 5 min。

（8）吸去上清，以 3 ml 洗涤缓冲液重悬沉淀，将所有细胞转移至一支试管中。

（9）取少量细胞悬液，加等体积的 0.4%台盼蓝溶液混匀，然后以血细胞计数板计数活细胞及死细胞。通常每个包皮可以获得 $(2\sim3)\times10^6$ 个细胞，细胞活力>90%。

3.3　角质形成细胞的免疫荧光标记

此部分介绍用整合素 α_6 及 CD71 抗体标记角质形成细胞的方法。所有的标记操作在置于冰上的 5 ml 聚丙烯圆底 FACS 管中进行，在生物安全层流橱中进行细胞的无菌操作。

（1）4℃400 *g* 离心细胞悬液 5 min 后，以 3 ml 封闭缓冲液重悬细胞。转移细胞悬液至 5 ml 的 FACS 管中，此为样本管，冰上孵育 15 min。

（2）转移 $(1\sim2)\times10^5$ 个细胞至 5 ml 的 FACS 管中，作为设定流式细胞仪所需的各种对照（表 10.1）。

（3）每管细胞悬液中加入适量相应的抗体，混匀，冰上孵育 45 min。每 15 min 振荡一次，空白对照及 7-AAD 对照管放置于冰上待用。如果细胞量较大（$>10^7$ 个），可将试管置于 4℃冷库的振荡器上振荡，以防止细胞沉积和成团。

（4）配制二抗的稀释液，即以封闭缓冲液分别配制山羊抗小鼠 IgG2b-FITC（1∶80）和链亲和素-APC（1∶250）。每管所需的体积与一抗相同（见表 10.1）。

（5）加 3 ml 洗涤缓冲液洗涤细胞，4℃400 *g* 离心 5 min，弃上清。再清洗一次。

（6）每管加适量的二抗稀释液，混匀，冰上孵育 45 min，每隔 15 min 振荡一次。

（7）清洗细胞两次（同步骤 5），最后一次清洗后，对于样本管按 3×10^6 个细胞/ml 的终浓度用洗涤缓冲液重悬细胞，而对照管则均以 500 μl 的洗涤缓冲液重悬细胞。

（8）如果出现细胞成团，可将细胞悬液过滤到带细胞过滤管盖的 5 ml 圆底管，将其除去以免堵塞流式细胞仪。

（9）在进行分选前，除空白对照管外，每管都加入 7-AAD（2 μg/ml 终浓度）。

3.4　流式细胞仪分析

此部分介绍设定细胞分选器的基本方法以用于分析和分选免疫荧光标记的角质形成

细胞。所有样本均在流式细胞仪（Becton Dickinson FACS Vantage™）中进行分析。此仪器通过其 488 nm 带通为 10 的滤光片收集前向光散射（FSC）信号，在前向光散射通道里放有一个 10 倍程的中性滤光片，而侧向光散射（SSC）信号是通过与激光束正交 90°的 488 nm/10 带通滤光片收集的。488 nm 的激光可激发异硫氰酸荧光素（FITC）及 7-AAD，其荧光发射可分别通过 530 nm（530DF30）滤光片及 670 nm 长通（long-pass）滤光片在荧光通道 1（FL1）和 FL3 收集。647 nm 的激光可激发 APC，其荧光发射波经 670 nm（670DF14）滤光片在 FL6 采集到。使用 CellQuest 软件（Becton Dickinson）进行分析数据，每一模式文件最少需要 10 000 个活细胞。对两种或更多荧光染料标记的样本来说，除了空白对照及 7-AAD 对照外，还需要设立单色对照（即单一荧光染料染色的细胞）以正确地设置流式细胞仪中的相关参数 [见注意事项（3）]。

（1）通过设置下列散点图建立分析模板：FSC 对 SSC；FSC 对 7-AAD；FITC 对 APC，在 10^1 处设置象限；FITC 对 7-AAD，在 10^1 处设置象限。

（2）检测未染色细胞（空白对照）。调整 FSC 及 SSC 的设定直至细胞出现于 FSC 对 SSC 散点图的中央，与图 10.1 A 所示类似。然后分别调节 FITC、APC 和 7-AAD 检测器的光电倍增管（PMT）电压直至细胞出现在不同散点图的左下象限内（图 10.1 C），这样就设立了这些参数的阴性荧光水平。

（3）测定 7-AAD 对照管。7-AAD 是一种容易通过死细胞和濒死细胞的细胞膜的脱氧核糖核酸染色剂。通过提高 FL1 减去 FL3 的差值直至 7-AAD 标记细胞出现在 FITC 与 7-AAD 散点图中的 FITC 参数阴性区域，从而扣除了 FITC 探测器所探测到的 7-AAD 荧光发射。在 FITC（FL1）参数中，只有当左下象限的细胞中位数值与左上象限的细胞中位数值相等时，才达到了正确的补偿。对于 APC 检测器来说不需要 7-AAD 补偿 [见注意事项（3）]。设定分选区域 R1 包括阴性的活细胞，如图 10.1 B 所示。

（4）测定 CD49f-FITC 单色对照管。应观察到两个独立的整合素 α_6 表达细胞群（图 10.1 D）。通过提高 FL3 减去 FL1 的差值直至 FITC 标记细胞出现在 7-AAD 参数阴性区域，从而扣除 7-AAD 探测器所探测到的 FITC 荧光发射。通过确保 7-AAD（FL3）参数的中右下象限细胞中位数值与左下象限细胞中位数值相等来证实正确的补偿值。对于 APC 检测器来说不需要 FITC 补偿 [见注意事项（3）]。

（5）检测 CD71-APC 单色对照管。图 10.1 E 显示了 CD71-APC 在 FITC 与 APC 散点图中的典型表达。对于 FITC 或 7-AAD 检测器都不用设立 APC 补偿 [见注意事项（3）]。

（6）分析同型抗体对照管。它主要是用于判断与一抗配对的同型抗体的非特异性结合。一般来说，都会出现一些非特异性结合的细胞（图 10.1 C）。

（7）测试整合素 α_6/CD71 双标记染色的样本。将 R1 所确定的活细胞门（区域）应用在 FITC 与 APC 散点图中以去除细胞碎片和没有活力的细胞来进行分析。如图 10.1 F 所示，整合素 α_6 和 CD71 标记基底角质形成细胞的双色荧光图具有高度可重复性（n＞300）。划定分选区域以区分角质形成干细胞（R2＝$\alpha_6^{bri}CD71^{dim}$）、TA 细胞（R3＝$\alpha_6^{bri}CD71^{bri}$）和分化细胞（R4＝α_6^{dim}）。可见，KSC 位于 α_6^{bri} 细胞群中 CD71 强阴性区域，设定的 KSC 分选区包括了这一表型的大多数细胞，同时也可以充分地与 TA 细胞区分开来。

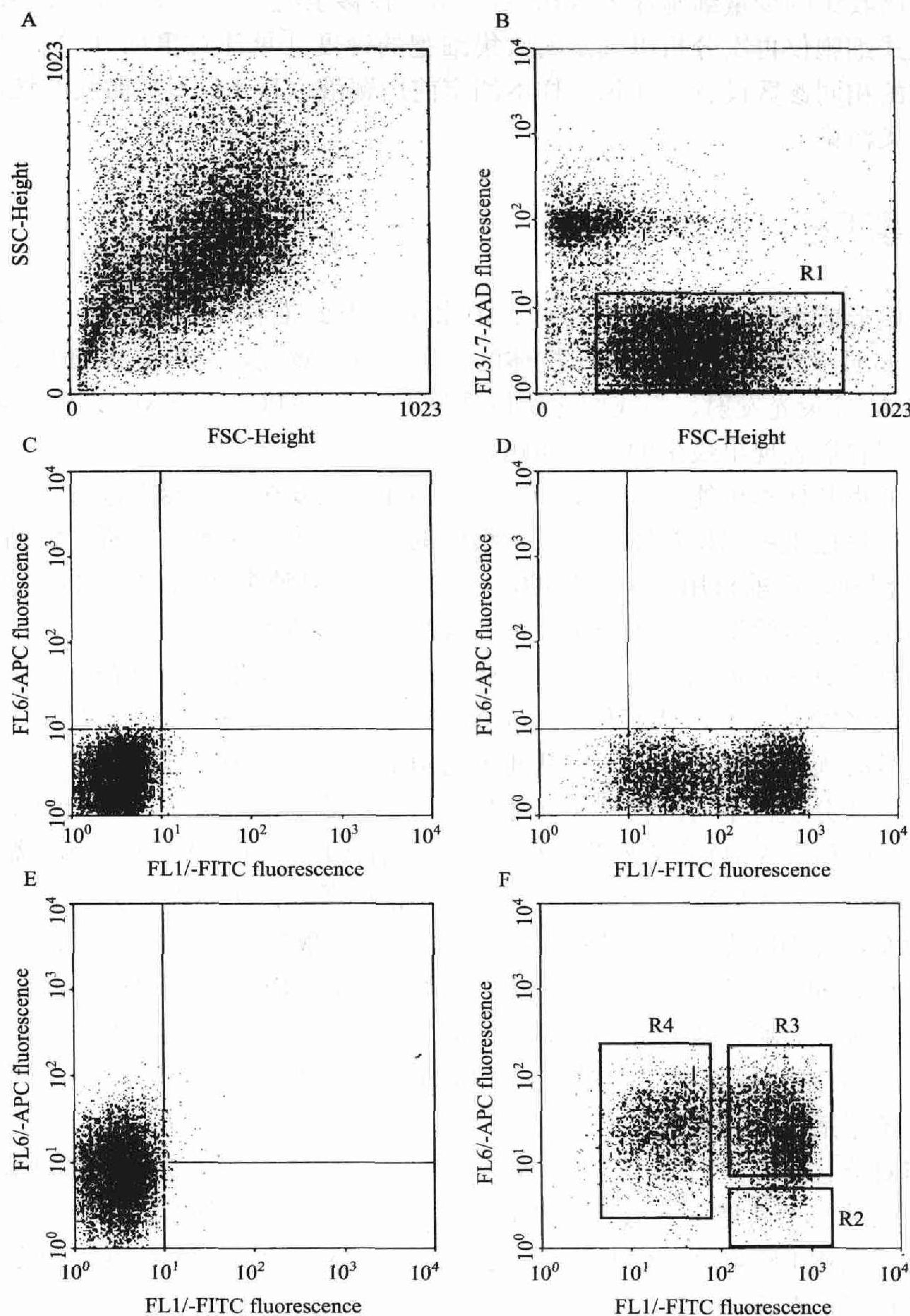


图 10.1 人包皮基底角质形成细胞整合素 α_6、CD71 荧光染色及其对照的流式细胞分析图

A. 包皮基底角质形成细胞的光散点图（空白对照组）。B. FSC 对 7-AAD 荧光的散点图，7-AAD 荧光的阴性细胞群（即活细胞）聚集在 R1 区内，此区无 7-AAD 阳性（死）细胞群。C. 同型配对对照抗体的双色荧光散点图。D 和 E. 整合素 α_6-FITC 和 CD71-APC 的单色对照荧光散点图。F. 整合素 α_6-FITC 和 CD71-AP 同时标记角质形成细胞的双色荧光散点图。R2 代表 α_6^{bri}CD71^{dim} 细胞，亦即角质形成干细胞；R3 代表 α_6^{bri}CD71^{bri} 细胞，亦即 TA 细胞；R4 代表 α_6^{dim} 细胞，亦即分化细胞。

（8）将这些角质形成细胞组分收集在盛有 1 ml KGM-2%BSA 的 5 ml FACS 管中。在收集细胞前，反复颠倒细胞收集管数次以便 KGM-2%BSA 包被在试管的内表面。

(9) 将所收集的少量细胞样本（10～20 μl）转移至盛有 200 μl 洗涤缓冲液的新试管中，用流式细胞仪再次分析以确定所收集细胞的纯度［见注意事项（4）］。使用细胞分选所确定的相同参数设置，在每个样本测定前用鞘液（Isoton II）彻底冲洗流式细胞仪以减少交叉污染。

4 注意事项

(1) 角质形成细胞表达 CD71 为低、中水平，因此推荐用强发射光的荧光染料如 APC、PE-cy5 或 PE 等来检测 CD71 抗体的结合。应注意到，有些流式细胞分析仪的配置不能测定 APC 荧光发射。而我们之所以选择 FITC、APC、7-AAD 的荧光染料组合，主要是考虑到它们表现出最少的补偿问题。

(2) 人的皮肤样本可能存在污染，因此必须在生物安全层流橱内进行无菌处理。处理过程中，尽量把组织保持在冰上以维持细胞的活力。为确保无菌，所有解剖器械应先以 70%乙醇浸泡，用前再用 PBS-AF 冲洗。实验后应以消毒防腐的漂白剂浸泡所有器械，彻底冲洗后高压消毒。按照相关规定处理废弃的人体组织。

(3) 两种或更多的荧光染料同时标记样本时，可能会发生光谱重叠，这会导致一种荧光染料的荧光发射波可以从其他荧光染料的荧光发射通道探测到，从而产生干扰信号。这些信号必须使用电子补偿网络从相关通道的检测信号中扣除。只有当完成所有的必需补偿时，从分选样本所测得的荧光才反映这些细胞上的“真实”荧光强度。我们采用 FITC、APC 和 7-AAD 的免疫荧光标记组合，在 FITC 与 7-AAD 之间所需的补偿最少；而在 FITC 或 7-AAD 与 APC 之间不存在补偿问题，因为这些荧光染料由不同波长的激光所激发，当细胞先后通过 488 nm 和 647 nm 的激光束时可以依次收集其荧光发射信号。然而，如果以 PE 检测 CD71 结合，则 FITC、PE 和 7-AAD 之间存在明显的荧光谱重叠。因此，必须进行适当的补偿，其方法类似于 3.4 所述。简言之，先检测 7-AAD 对照，接着是 α_6-FITC 单色对照及其后的 CD71-PE 单色对照，对每一样本的所有荧光参数均给予适当的补偿调节。

(4) 当对分选细胞进行细胞纯度的再次分析时，将会有一些细胞偏离原来收集细胞时所设定的区域。尤其是再次分析 α_6^{bri}CD71^{bri} 细胞时，常观察到 CD71 参数相关的细胞群稍微上移。当用 PE 来检测 CD71 时，此现象更明显，而使用 APC 可使此现象的发生率减少到可接受的范围内。

致　谢：感谢 Andrew Fryga 提供专业的流式细胞分析技术细节和对本章流式细胞仪部分的批评性阅读。

（罗海水 译　彭代智 校）

参 考 文 献

[1] Morris, R. J., Fischer, S. M., and Slaga, T. J. (1985) Evidence that the centrally and peripherally located cells in the murine epidermal proliferative unit are two distinct cell populations. *J Invest. Dermatol.* **84 (4)**,

277—281.

[2] Mackenzie, I. C. and Bickenbach, J. R. (1985) Label-retaining keratinocytes and Langerhans cells in mouse epithelia. *Cell Tissue Res*. **242**, 551—556.

[3] Bickenbach, J. R., McCutecheon, J., and Mackenzie, I. C. (1986) Rate of loss of tritiated thymidine label in basal cells in mouse epithelial tissues. *Cell Tissue Kinet*. **19**, 325—333.

[4] Morris, R. J. and Potten, C. S. (1994) Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Prolif*. **27**, 279—289.

[5] Potten, C. S. and Hendry, J. H. (1973) Letter: clonogenic cells and stem cells in epidermis. *Int. J. Radiat. Biol.* **24**, 537—540.

[6] Bickenbach, J. R. and Holbrook, K. A. (1987) Label-retaining cells in human embryonic and fetal epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **88**, 42—46.

[7] Bickenbach, J. R. and Mackenzie, I. C. (1984) Identification and localization of labelretaining cells in hamster epithelia. *J. Invest. Dermatol.* **82**, 618—622.

[8] Potten, C. S. (1975) Epidermal cell production rates. *J. Invest. Dermatol.* **65**, 488—500.

[9] Potten, C. S. (1986) Cell cycles in cell hierarchies. *Int. J. Radiat. Biol.* **49**, 257—278.

[10] Allen, T. D. and Potten, C. S. (1974) Fine-structural identification and organization of the epidermal proliferative unit. *J. Cell Sci.* **15**, 291—319.

[11] Christophers, E. (1971) Cellular architecture of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **56**, 165—169.

[12] Barrandon, Y. and Green, H. (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2302—2306.

[13] Jones, P. H., Harper, S., and Watt, F. M. (1995) Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* **80**, 83—93.

[14] Jones, P. H. and Watt, F. M. (1993) Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* **73**, 713—724.

[15] Kaur, P. and Li, A. (2000) Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 413—420.

[16] Bickenbach, J. R. and Chism, E. (1998) Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp. Cell Res*. **244**, 184—195.

[17] Albert, M. R., Foster, R. A., and Vogel, J. C. (2001) Murine epidermal label-retaining cells isolated by flow cytometry do not express the stem cell markers CD34, Sca-1, or Flk-1. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 943—948.

[18] Li, A., Simmons, P. J., and Kaur, P. (1998) Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3902—3907.

[19] Tani, H., Morris, R. J., and Kaur, P. (2000) Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10,960—10,965.

[20] Stenn, K. S., Link, R., Moellmann, G., Madri, J., and Kuklinska, E. (1989) Dispase, a neutral protease from Bacillus polymyxa, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J. Invest. Dermatol.* **93**, 287—290.

[21] Poumay, Y., Roland, I. H., Laclercq-Smekens, M., and Leloup, R. (1994) Basal detachment of the epidermis using dispase: tissue spatial organization and fate of integrin $\alpha6\beta4$ and hemidesmosomes. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 111—117.

第 11 章　上皮干细胞的分离、鉴定与培养

Jackie R. Bickenbach

摘　要：目前普遍认为不断更新的成年机体组织（如表皮）的动态平衡是由成体干细胞来维持的。成体干细胞是未分化、能够自我更新的细胞，它们也能分化成子代的短暂扩充（TA）细胞，成为组织内的主要增殖细胞群体。尽管 TA 细胞也有一定的增殖能力，但是目前认为，它们仅能进行有限次数的分裂，之后就会离开细胞增殖区域，朝向终末分化。而干细胞则被认为持续存在于机体的整个生命过程。1981 年，我们已经在小鼠的复层鳞状上皮细胞中鉴定出一小群标记滞留细胞（LRC），从而直接证明了小鼠表皮的细胞增殖区域里存在假定的干细胞。从那以后，我们已经建立了亦即本章所要叙述的分离表皮干细胞的方法。我们的研究表明，表皮干细胞均为角蛋白 14 阳性（$K14^+$），而且都来源于角质形成细胞而非间充质细胞或造血细胞。研究也显示了表皮干细胞能够再生表皮，并能在再生组织中永久地表达重组基因；同时大多数的表皮干细胞均处于细胞周期的 G_1 期，而不是持续进行分裂。它们能够表达增殖性基因及有丝分裂的细胞周期蛋白 B_1。我们的最新研究表明，处于应激环境下，如辐射、创伤，或者将表皮干细胞注入一个正在发育的胚泡环境中，表皮干细胞能够改变它们在体内的细胞命运。因此，如何将表皮干细胞分离出来是表皮干细胞用于细胞和基因治疗的关键。
关键词：干细胞；表皮；可塑性；皮肤

1　导言

不断更新的上皮组织的稳定内环境是靠成体干细胞来维持的[1~3]。成体干细胞是未分化、能够自我更新的细胞，它们也能够分化成子代的短暂扩充（TA）细胞，构成主要的增殖细胞群体。TA 细胞经历有限次数的分裂后，就会离开细胞增殖区，朝向终末分化，而干细胞则被认为持续存在于机体的整个生命过程。我们已通过一系列的氚化胸腺嘧啶脱氧核苷标记实验显示，来源于成年小鼠皮肤的干细胞并不像其他基底细胞一样频繁地进行细胞分裂，而是在体内以稳定的速率进行分裂[4,5]。我们也证实在机体的整个生命过程中它们能在体内持续增殖，同时在体外也有很强的增殖潜能。然而，干细胞的分离一直存在诸多问题。我们联合了两种不同的方法获得了目前的结果：一种是已发表的分离造血干细胞的烟碱己可碱（Hoechst）和碘化丙啶（PI）染色法[6]，另一种是测定一种细胞大小来判定上皮细胞的最大增殖潜能[7]。通过联合应用特定的参数设定，我们已将小鼠表皮基底细胞分成三个组分：干细胞、TA 细胞和非增殖基底细胞[8]。新鲜分离的表皮干细胞有 90%以上处于细胞周期的 G_0/G_1 期，而 20%以上的 TA 细胞分裂活跃。最近，我们的研究显示在正常皮肤组织再生过程中，表皮干细胞开始贯穿整个

细胞周期[9]。尽管表皮干细胞和TA细胞都有保持增殖的能力，但只有表皮干细胞经培养可形成更大的、扩展性更强的集落。两种细胞群均能以逆转录病毒为载体进行转导，并用于形成生物工程化的表皮。然而，在器官型培养中，只有表皮干细胞形成的表皮能够持续生长并表达报告基因达6个月，而TA细胞形成的表皮则在2个月内就完全分化。我们还明确了这些表皮干细胞也具有显著参与其他组织形成的能力，这种可塑性类似于胚胎干细胞和其他少数成体干细胞[10]。将从新生小鼠皮肤分离出的成体表皮干细胞注入胚泡后，它们可掺入多种组织并改变其表型。可见，这些干细胞的命运似乎是由它们对其所处环境的直接反应来决定的。最近，我们已明确这种分选技术也能从成年小鼠的皮肤和腭部上皮，以及成人的皮肤、牙龈、牙槽黏膜及腭部上皮获得有活力的干细胞。因此，这种新颖的分选技术能够获得纯化的、有活力的上皮干细胞，并能用于生物工程化组织，以及在有前景的基因和细胞治疗中尝试重组基因的永久性表达。

2 材料

2.1 组织和试剂仪器

(1) ICR小鼠来源于Harlan Labs。

(2) C57BL/6J和C57BL/6-TgN（ACTbEGFP）1Osb小鼠由Jackson Labs引种。

(3) 成人乳房缩小术和普外科手术后废弃的成人皮肤标本。

(4) 来源于成人牙周病治疗所废弃的成人牙龈、牙槽和腭部标本。

(5) 所有的培养基、添加剂和酶［K-SFM、DK-SFM、DMEM、SMEM，青霉素、链霉素和抗非霉素D（PSA），胰蛋白酶、胰蛋白酶抑制剂，PBS］均来自Life Technologies。

(6) 中性蛋白酶II和IV型胶原购自Collaborative Biomedical。

(7) Hoechst33342和PI染料购自Sigma。

(8) 配有三种激发光光源（氩离子激光器的波长为488 nm；染料激光器的波长为595 nm；氪激光器为波长351～364 nm或406 nm的紫外光）的Becton Dickinon FACS DiVa流式细胞仪，9个荧光通道，2个光散射通道。此型号的流式细胞仪可以高达5×10^4个细胞/s的速度分选细胞。

2.2 储存液的配制

(1) 以SMEM培养基配制Hoechst33342（1 mg/ml），分装后于－80℃避光保存，避免反复冻融。在9.9 ml SMEM中加入100 μl HEPES、50 μl Hoechst储存液（终浓度为5 μg/ml），以0.22μm滤器过滤除菌，4℃保存；即用即配。

(2) 以SMEM培养基配制PI（1 mg/ml），可于4℃避光保存数月。在9.9 ml SMEM中加入100 μl HEPES、5 μl PI储存液（终浓度为0.5 μg/ml），以0.22μm滤器过滤除菌，4℃保存；即用即配。

(3) 25 mg/ml HEPES缓冲液，配制后于4℃保存，直到用完。

2.3 以IV型胶原包被培养皿

(1) 将IV型胶原储存液（每瓶装1 mg）置于4℃过夜（或需更长时间），使其逐渐融化，期间要不间断地振荡。

(2) 以乙醇彻底擦净通风橱，包括橱壁，移去使用过的移液管等物品。用乙醇擦净金属托盘以去除灰尘。

(3) 取0.5 ml 37%HCl加无菌去离子水定容至100 ml，混匀可得到0.05 mol/L的HCl溶液。

(4) 加1 mg IV型胶原至100 ml 0.05 mol/L HCl溶液中。

(5) 以1 μg/cm^{2}的IV型胶原密度包被培养皿。

(6) 将其静置于细胞培养通风橱内1 h。

(7) 吸弃培养皿内的所有液体。

(8) 先后以PBS、去离子水冲洗培养皿，并彻底风干。

(9) 将已包被的培养皿保存在4℃，可保存数月。

3 方法

3.1 小鼠皮肤和口腔黏膜角质形成细胞的初步分离

(1) 以酒精火焰消毒镊子和剪刀。

(2) 以无菌剪刀和镊子从小鼠剪取皮肤，或以无菌手术刀（11号刀片）切取腭部组织。

(3) 处理小鼠皮肤和腭部样本的方法相同。

(4) 在室温下将组织放于含10%PSA的SMEM溶液中1 h。

(5) 如有必要，将组织块切剪成宽度和长度分别不大于4 mm和40 mm的条状。

(6) 在无菌培养皿内，将组织的结缔组织面朝下浸于中性蛋白酶II溶液中，4℃过夜。次日早上将中性蛋白酶II溶液除去。

(7) 以无菌镊从结缔组织上分离上皮。在立体显微镜下更有利于操作。

(8) 将上皮组织放入50 ml的离心管中，加入0.25%胰蛋白酶浸没样本，于37℃水浴箱孵育30 min后用力振荡离心管。

(9) 加入与胰蛋白酶等体积的胰蛋白酶抑制剂（0.25 mg/ml），终止胰蛋白酶消化反应。

(10) 将胰蛋白酶消化得到的细胞悬液通过70 μm的无菌细胞滤器以去除大的颗粒。

(11) 计数细胞，400 *g* 离心细胞悬液10 min，弃上清。

3.2 人皮肤和口腔黏膜角质形成细胞的初步分离

(1) 收集废弃的外科病理皮肤标本或牙周病治疗后废弃的牙龈、牙槽和腭部组织样本，并在术后2 d内使用，4℃保存于培养基中直到需用时。

(2) 用90%DMEM和10%PSA的混合液于室温下浸泡标本1 h并确保无菌。

(3) 以酒精火焰消毒镊子、剪刀及手术刀。

(4) 无菌条件下将皮肤样本切成长而窄的条状（宽小于 4 mm，这可保证中性蛋白酶 II 溶液能够完全进入结缔组织和表皮之间发挥作用），然后用 PBS 冲洗。

(5) 向培养皿中加入中性蛋白酶 II 溶液，直至覆盖所有的组织。4℃孵育过夜。次日早上去除中性蛋白酶 II 溶液。

(6) 以无菌镊将结缔组织与上皮分离。立体显微镜下更有利于操作。

(7) 将上皮组织放入 50 ml 的离心管中，加入 0.25%胰蛋白酶浸没每一样本，于 37℃水浴箱中孵育 30～40 min 后用力振荡离心管。

(8) 胰蛋白酶消化后，加入与胰蛋白酶等体积的胰蛋白酶抑制剂（0.25 mg/ml）终止消化反应。

(9) 用 70 μm 无菌细胞滤器过滤经胰蛋白酶消化过的细胞悬液以去除大的颗粒。

(10) 计数细胞，400 *g* 离心 10 min，弃上清。

3.3 细胞分选的准备

(1) 以 1 ml Hoechst 染色液重悬 1×10^6 个细胞。

(2) 在 37℃下避光（可以用箔片包裹试管）孵育 Hoechst 染色液中的细胞 90 min。每隔 30 min 轻柔地摇动试管重悬细胞，以防止细胞沉于试管底。

(3) 离心后将 $5\times10^6\sim1\times10^7$ 个细胞重悬于 PI 溶液中，用 70 μm 无菌细胞滤器过滤细胞悬液。

(4) 将试管放于冰桶中，送至流式细胞仪进行细胞分选。注：事先准备一盛有 5 ml 培养基的 15 ml 圆锥形试管来收集细胞。

3.4 细胞分选法

将盛有单个细胞悬液的试管置于 Becton Dickinon DiVa 流式细胞仪上，样本由于负压作用而被吸入硅橡胶管，再输注至一个直径为 100～130 μm 的高速喷嘴中。包含负压鞘液的喷嘴通过流体动力学原理可使细胞聚焦在一点，并从喷嘴逐个流出，而且不偏离分层共轴液流的中心，这就为通过仪器从喷嘴出来的每个细胞提供了可预测的轨道。激光聚焦在细胞流上，每个细胞通过激光时即可得到其信号。

光电倍增管和固态探测器（光电二极管）收集来自每个细胞的光子发射，并将其转化成模拟电压，此模拟信号被模数转换器数字化处理后储存在磁介质上用于分析。滤光片放置于检测器前，只有与特定荧光染料发射波长相应的光才能通过每一检测器而被收集到（如 FITC 发射在绿光区，因此 525 nm 的带通滤光片可用来收集此种荧光染料的发射光）。

与激光相同波长和相同方向发生的散射光主要来自细胞的表面，且与细胞的相对大小相关（称为前向角光散射）。与激光方向成 90°发生的散射光（正交散射或侧向散射）来自细胞的内部结构，与细胞的颗粒性相关。通过联合这两种参数可以分离或去除与相对特定大小相对应的细胞亚群。不需要的信号，如来自细胞碎片或细胞聚集体等的干扰信号也能被检测到，并予以排除。以 Hoechst 和（或）PI 或其他标记 DNA 的荧光染料进行染色后的细胞，也能根据细胞着色的量来进行检测和分析。数据通过网络化计算机系统以直方图的形式显示和进行分析（图 11.1）。

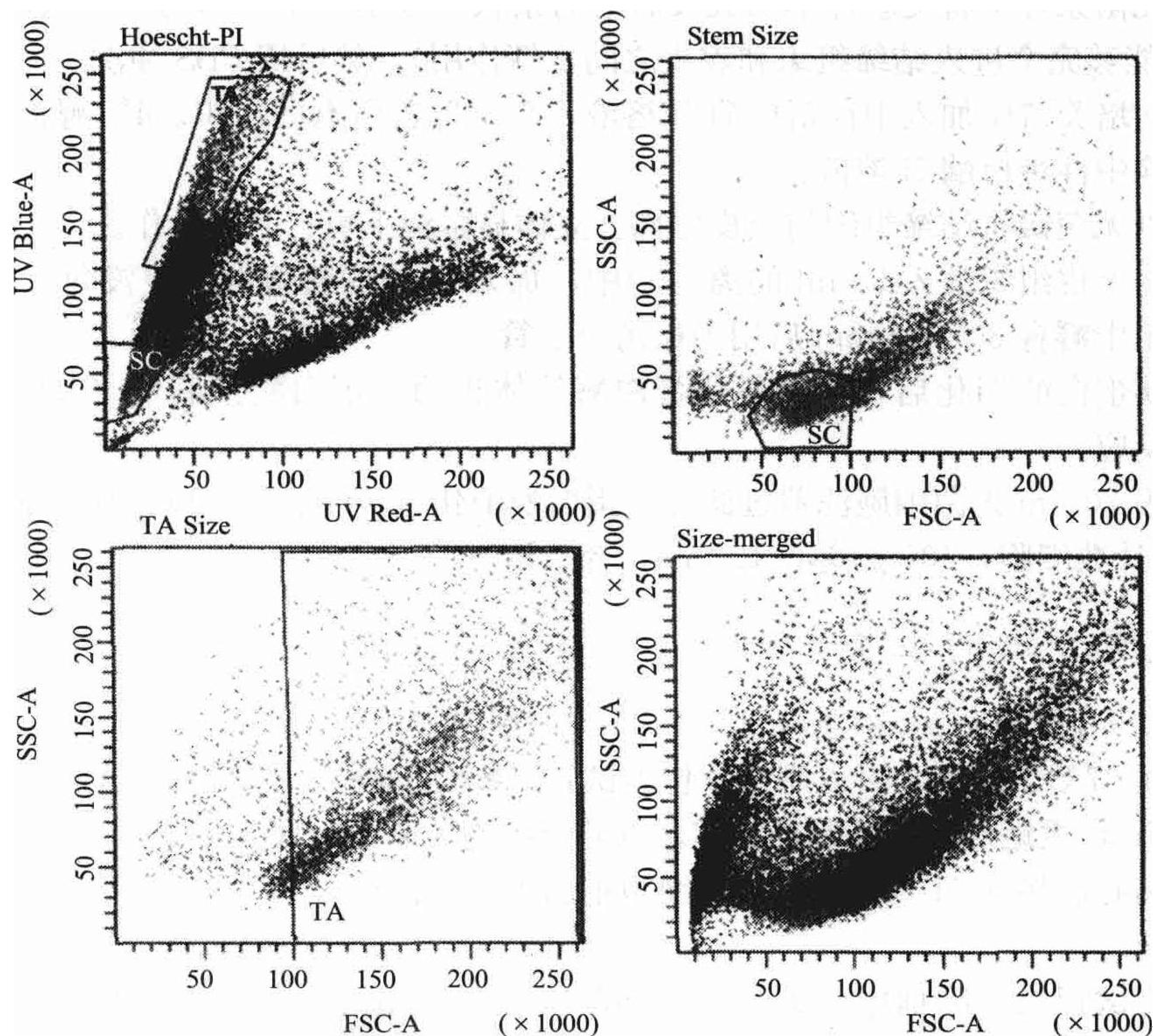


图 11.1 表皮干细胞和 TA 细胞分选参数的散点图

干细胞可依据其弱暗的 Hoechst 红/蓝荧光首先进行分选（左上图的“SC”区域），然后通过其细胞较小的特点而分选得到（右上图的“SC”区域）。TA 细胞先通过其强亮的 Hoechst 红/蓝荧光进行分选（左上图的“TA”区域），然后通过其细胞较大的特点分选得到（左下图的“TA”区域）。右下图表示所有细胞群体的相对大小。

采用此仪器的细胞分选功能可分离得到无菌的细胞亚群，用于后续的实验。与喷嘴相连的带电石英晶体驱使细胞流发生振荡以形成微滴。在足够高的频率下所形成的微滴可以使每个微滴只包含一个细胞。当细胞满足实验者所设定的和细胞分选窗口所确定的参数标准时，分选细胞的电子设备会在含有实验细胞的微滴正在偏离细胞液流的准确时间恰好给细胞流加上一个电荷。微滴通过的两块金属电极板之间存在非常高的电压，所产生的磁场力迫使带电荷的微滴向某一块电极板偏移，偏移的方向取决于微滴所带电荷的正负。在偏移的微滴路径中放置一个收集管，可以以每秒数千个细胞的速度收集到纯度高达 99%的细胞群体。

我们的目的就是基于细胞的大小及细胞排斥 Hoechst 和 PI 染料的能力来分选两种细胞群体。表皮干细胞（图 11.1 的 SC）较小且对两种染料都拒染；TA 细胞（图 11.1 的 TA）比干细胞要大，可被 Hoechst 适度染色，但对 PI 拒染。

3.5 分选细胞的培养

（1）分选后，离心分选的干细胞和 TA 细胞，以培养基重悬。

（2）按照约 2×10^3 个细胞/cm^2 的密度接种于 IV 型胶原包被的培养皿中。

(3) 在36.5℃饱和湿度的CO_2培养箱中培养。

a. 从新生和成年小鼠的皮肤和口腔黏膜分选出来的角质形成干细胞，按制造商的说明书在DK-SFM中可以培养数代。

b. 所分选的成人皮肤角质形成干细胞，按制造商的说明书在K-SFM中可以培养至少8代。

c. 从成人牙槽、牙龈及腭部组织中分选出的角质形成干细胞，按制造商的说明书在DK-SFM中可以培养至少3代。

4 注意事项

(1) 总体来说，最重要的一点是保持从流式细胞仪所获得的细胞模式一致（图11.1)。如果你注意到变异很大，就要保证所用的Hoechst染料新鲜或没有被反复冻融。

(2) 不要担心有较多的死细胞，因为在首次分选窗口的设置时，就可以将它们去除。死细胞通常是胰蛋白酶消化时间过长所致。

(3) 为了清楚地区别干细胞和TA细胞，要保持荧光的窗口设置和细胞大小的窗口设置相互远离（图11.1)。

(4) 细胞可用含其他添加剂的培养基或3T3饲养细胞进行培养。

(5) 如果培养基的钙离子水平升高，则如前所述，培养的细胞可以被诱导发生分化。

(6) 最后，每种流式细胞仪会稍有不同。因此，为了建立相应的细胞分选系统，必须建立常规的Hoechst/PI染色的窗口设置参数和细胞大小的窗口设置参数，然后再做调整以确保细胞得到恰当的分选，使每次分选结果能够保持一致。

致　谢：作者感谢Bickenbach实验室过去和现在的工作人员对建立细胞分离和培养方法所作的贡献，尤其感谢Luchuan Liang、Ann Tomanek-Chalkley、Tony Manuel、Martine Dunnwald和Dana Alexandrunas等博士，感谢UI流式细胞仪中心的工作人员Justin Fishbaugh和Gene Hess。

（罗海水 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Cairns, J. (1975) Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* **255**, 197 - 200.

[2] Potten, C. S., Owen, G., and Booth, D. (2002) Intestinal stem cells protect their genome byselective segregation of template DNA strands. *J. Cell Sci.* **115**, 2381—2388.

[3] Potten, C. S. (1997) Stem Cells. London: Academic Press.

[4] Bickenbach, J. R. (1981) Identification of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J. Dent. Res.* **122C**, 1611—1620.

[5] Bickenbach, J. R., McCutcheon, J., and Mackenzie, I. C. (1986) Rate of loss of tritiated thymidine label in basal cells in mouse epithelial tissue. *Cell Tissue Kinet.* **19**, 325—333.

[6] Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., and ulligan, R. C. (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* **183**, 1797—1806.

[7] Barrandon, Y. and Green, H. (1985) Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5390—5394.

[8] Dunnwald, M., Tomanek-Chalkley, A., Alexandrunas, D., Fishbaugh, J., and Bickenbach, J. R. (2001) Isolating a pure population of epidermal stem cells for gene use in tissue engineering. *Exp. Dermatol.* **10**, 45—54.

[9] Dunnwald, M., Chinnathambi, S., Alexandrunas, D., and Bickenbach, J. (2003) Mouse epidermal stem cells proceed through the cell cycle. *J. Cell Physiol.* **195**, 194—201.

[10] Liang, L. and Bickenbach, J. R. (2002) Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells* **20**, 3—10.

[11] Liang, L., Chinnathambi, S., Stern, M., Tomanek-Chalkley, A., Manuel, T. D., and Bickenbach, J. R. (2004) As epidermal stem cells age they do not substantially change their characteristics. *J. Invest. Dermatol. Montagna. Supplement.* (in press).

[12] Bickenback, J. R. and Chinnathambi, S. (2004) Plasticity and potential of epidermal stem cells, in *Progress in Stem Cell Research* (Emura, M. ed.), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY.

第12章　角蛋白19作为体内和体外干细胞的标志

Danielle Larouche，Cindy Hayward，Kristine Cuffley，Lucie Germain

摘　要：皮肤是一种能自我更新的组织，其中已终末分化的角质形成细胞能由正在增殖分化的新生上皮细胞所替代。皮肤能够终生快速而持续地更新，有赖于一类具有独特性能的细胞，即干细胞。这些细胞处于相对未分化的状态，在其整个生命期中具有高度的自我更新能力和增殖潜能，而且通常处于慢周期。移植培养的表皮能长期再生的现象说明，体外培养的表皮内存在表皮干细胞。动物体内的表皮干细胞可以根据它们的慢周期特性用［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷或溴脱氧尿苷鉴定。细胞标志如角蛋白19的发现，也使人体内表皮干细胞的研究成为可能。本章描述了利用干细胞的慢周期和表达角蛋白19的特性进行表皮干细胞研究的方法。实验方法包括原位组织内角蛋白19和标记保留细胞（［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷放射自显影）双标记技术。流式细胞术角蛋白19免疫荧光标记可用于表皮干细胞的体外研究。

关键词：干细胞；角蛋白；角蛋白19；表皮；毛囊；人皮肤；流式细胞术

1　导言

皮肤是一种能自我更新的组织，其中的终末分化角质形成细胞能被不断进行增殖和分化的新生上皮细胞所替代。皮肤这种能够终生快速而持续增殖的特性依赖于一类具有独特性质的细胞——干细胞。这些细胞相对未分化，具有高度的自我更新能力和增殖潜能，而且通常处于慢周期。培养表皮移植后能长期再生说明，体外培养的表皮内存在表皮干细胞[1~3]。动物体内的表皮干细胞可以根据它们的慢周期特性用［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷或溴脱氧尿苷鉴别。细胞标志如角蛋白19的发现，也使人体内表皮干细胞的研究成为可能[4]。本章详细描述了利用干细胞的慢周期和表达角蛋白19的特性进行表皮干细胞研究的方法[3~6]，这些方法包括原位组织标记和体外细胞标记。

2　材料

2.1　免疫荧光染色抗体

2.1.1　一抗

（1）豚鼠抗小鼠角蛋白19[7]：豚鼠产生的一种多克隆抗体，针对小鼠角蛋白19（K19）的特异性氨基酸序列391～404（NH_2-Glu-Ala-His-Tyr-Asn-Asn-Leu-Pro-Thr-Pro-Lys-Ala-Ile-OH）。经检测血清可按1∶500到1∶2000稀释使用。

(2) 小鼠抗人 K19 单克隆抗体（cat. no. 03-61010，Ks 19.1，American Research Product，Belmont，MA）。

(3) 小鼠抗人 K18 单克隆抗体（cat. no. 03-61009，Ks 18.174，American Research Product，Belmont，MA）。

(4) 小鼠抗人 K20 单克隆抗体（cat. no. 03-61054，Ks 20.10，American Research Product，Belmont，MA）。

2.1.2 二抗

(1) FITC 标记的山羊抗豚鼠 IgG（H+L）(cat. no. 106-095-003，Jackson ImmunoRes Laboratories，West Grove，PA)。得克萨斯红标记的山羊抗豚鼠 IgG（H+L）(cat. no. 106-075-003，Jackson ImmunoRes Laboratories）或荧光素（DTAF）标记的山羊抗豚鼠 IgG（H+L）(cat. no. JPG015003，Accurate Chemical & Scientific Corporation，Westbury，NY）可以作为替代。

(2) FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG（H+L）(cat. no. Ap-130F，Chemicon，Temecula，CA)

(3) 罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG-IgM（cat. no. Ap-130R，Chemicon，Temecula，CA)。

2.2 动物和放射性探针

(1) 成年和新生的 SENCAR 小鼠（Harlan Sprague-Dawley，Indianapolis，IN; from Charles River)。

(2) [甲基-^{3}H] -胸腺嘧啶脱氧核苷，比活性为 40～85 Ci/mmol（NEN-Dupont 公司)。将 [甲基-^{3}H] -胸腺嘧啶脱氧核苷溶解于 0.85%灭菌氯化钠溶液内制成注射液，每只小鼠注射 15 μl，约为 5 μCi/g 体重。

(3) Alzet 渗透性微型注射泵（2002 型，Alza Corp.，Palo Alto，CA)。

2.3 组织保存

(1) 最适切割温度（OCT）复合物（Miles Inc.，Elkhart，IN)。

(2) 小液氮储存容器。

(3) Superfrost 玻璃载玻片（cat. no. 12-550-15，Fisher Scientific，Nepean，Ont)。

2.4 免疫荧光染色和流式细胞仪分析

(1) 蒸馏水。

(2) 磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）-Ca：137 mmol/L NaCl，2.7 mmol/L KCl，6.5 mmol/L Na_2HPO_4，1.5 mmol/L KH_2PO_4，0.5 mmol/L $MgCl_2$，0.9 mmol/L $CaCl_2$。配制 1 L 上述溶液，需要溶解 8 g NaCl、0.2 g KCl、0.92 g Na_2HPO_4、0.2 g KH_2PO_4，并加入 0.17 ml 储存于－20℃的 2.8 mol/L 的 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 和 0.131 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$。蒸馏水定容至 1 L，调整 pH 为 7.4 [见注意事项 (1)]。

（3）PBS-Ca-牛血清白蛋白（BSA）：含有1%BSA的PBS-Ca。将1 g BSA溶于100 ml PBS-Ca中。

（4）液体封片剂：137 mmol/L NaCl，0.1 mol/L 甘氨酸，22 mmol/L NaN_3，8.75 mmol/L NaOH。配制100 ml上述溶液，需要将0.85 g NaCl、0.725 g甘氨酸、0.05 g NaN_3 和0.035 g NaOH溶于40 ml蒸馏水中，用蒸馏水调整容积为50 ml，调整pH为8.6，然后加入50 ml甘油。此试剂适用于临时封片，因其可以轻易洗掉。

（5）固体封片剂：137 mmol/L NaCl，2.7 mmol/L KCl，6.5 mmol/L Na_2HPO_4，1.5 mmol/L KH_2PO_4，22 mmol/L NaN_3，1.5%明胶。配置62 ml上述溶液，需将0.8 g明胶溶于热水，然后加入0.224 g NaCl、0.0056 g KCl、0.0258 g Na_2HPO_4、0.0056 g KH_2PO_4、0.04 g NaN_3，再加入25 ml蒸馏水，调整pH为7.6，蒸馏水加至40 ml，最后加入12 ml甘油。

2.5 K19和胸腺嘧啶脱氧核苷标记保留细胞共区域化双标过程

（1）带红色滤镜的Kodak Safelight2号安全灯（Kodak Safelight，cat. no. 152-1525，Kodak，Rochester，NY）。

（2）Lab-Tek载玻片盒（microscope slide mailer；cat. no. 25608-874，VWR，Montreal，Qc；Sakura Finetek 4310）。

（3）黑色塑料显微镜玻片盒（cat. no. 48444-004，VWR，BD Biosciences 423843）。

（4）乳胶溶液NTB-2（cat. no. KP 165-4433，Kodak，Rochester，NY）。

（5）染色盘（cat. no. 4456，Somagen，Edmonton，Alberta）。

（6）铝箔、透明胶带、Kleenex面纸、手套和干燥剂。

（7）Kodak Dektol显影液（cat. no. KP 146-4726，Kodak）。

（8）定影液（Kodak快速定影液，cat. no. KP 146-4106，Kodak）。定影储备液：49.8 ml溶液A，5.47 ml溶液B，蒸馏水稀释至200 ml。工作定影液：将定影储备液与蒸馏水按1∶3混合。

（9）显影液：蒸馏水加热至38℃，将Dektol溶于温水并定容为3.8 L；工作显影液：将储存液与蒸馏水按1∶1混合。

2.6 流式细胞术分析

（1）盐水：137 mmol/L NaCl。将8.5 g NaCl溶于1 L蒸馏水，即得1 L盐水。

（2）1×PBS：137 mmol/L NaCl，2.7 mmol/L KCl，6.5 mmol/L Na_2HPO_4，1.5 mmol/L KH_2PO_4。欲配制2 L上述溶液，需将16 g NaCl、0.4 g KCl、1.85 g Na_2HPO_4 和0.4 g KH_2PO_4 溶于蒸馏水并定容为2 L［见注意事项（2）］。

（3）PBS-BSA：含有1% BSA的PBS，将1 g BSA溶于100 ml PBS。

（4）在15 ml的圆锥形试管（cat. no. Falcon BD-35 2096，VWR，Montreal）内进行标记。

3 方法

3.1～3.4 描述的双标记法，即用间接免疫荧光法标记 K19 和用放射自显影技术检测［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷来检测标记保留细胞，以区分干细胞。

3.1 ［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷体内标记

（1）用 25 μl 规格的 Hamilton 注射器皮下或腹腔内注射 15 μl［甲基-^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷［见注意事项（3）］。

（2）谨慎操作，不要惊动母鼠，以免母鼠拒绝哺乳。

（3）小鼠出生后的头 7 d，每 12 h 重复上述两个步骤。

（4）小鼠出生 28 d 后处死小鼠，切除皮肤（背部或其他部位）并立即进行组织保存。

3.2 组织保存和切片

（1）将不同部位的人皮肤或小鼠皮肤切割成小片（1～5 mm 宽的矩形）。

（2）将 OCT 置于组织固定器上，并用镊子将其浸入液氮内 2～3 s，在 OCT 完全变白以前从液氮内移出。

（3）用镊子取一片组织，置于组织固定器上的液态 OCT 内。

（4）在组织样本上面添加 OCT 包埋组织，防止冷冻干燥。

（5）用镊子将组织固定器浸于液氮内约 15 s，使 OCT 变白而不龟裂。

（6）将包埋的组织块保存于－70℃备用。

（7）用恒冷切片机将组织切成 4 μm 厚的切片，并置于玻璃载玻片上［见注意事项（4）］。

（8）用铅笔标记每张玻片。

（9）将切片置于 37℃的盘内烘干 30 min。

（10）进行免疫荧光染色或将切片保存于－20℃（可保存数周）。

3.3 免疫荧光染色

（1）将切片从冷冻容器内取出，置于室温下 5 min 以除去过多的湿气。如果组织切片很小，可以用钻石笔沿组织周边在玻片上圈出来。

（2）将切片浸入－20℃的丙酮内，固定 10 min。

（3）PBS-Ca 清洗三次，每次 5 min。将切片置于片架上并浸入三个 PBS-Ca 池内浸洗。

（4）用一抗孵育。吸掉切片周围的液体，操作要迅速，以免切片干燥。每张切片上面滴加 PBS-Ca-BSA 稀释的抗体 25～50 μl，覆盖切片。另将 PBS-Ca-BSA 或无关抗体加于对照切片，室温孵育 45 min。

（5）PBS-Ca 清洗三次，每次 5 min。将切片置于片架上并浸入三个 PBS-Ca 池内洗涤。清洗时注意操作要轻柔，以免脱片。

（6）二抗孵育。吸掉切片周围的液体，操作要迅速，以免切片干燥。每张切片上面滴加以 PBS-Ca-BSA 稀释的抗体 25～50 μl。另将 PBS-Ca-BSA 或无关抗体加于对照切片。避光室温孵育 30 min。

（7）PBS-Ca 清洗三次，每次 5 min。将切片置于片架上并浸入三个 PBS-Ca 池内洗涤。清洗时注意操作要轻柔，以免脱片。

（8）要进行放射自显影标记时，先将切片在避光条件下保留于 PBS-Ca 内，直至加入乳胶溶液。不能让切片干燥。为了证实荧光标记的成功，可将一张或多张切片用液体封片剂封片。显微镜下观察后，将切片浸入 PBS 内数分钟洗掉封片剂，直到盖玻片能轻易从切片上脱落。

（9）要单独进行间接免疫荧光染色时，见 3.5。

3.4 放射自显影

3.4.1 暗室准备

（1）要确保暗室是完全避光的。关键步骤需要在完全黑暗的条件下进行操作；或者作为替代，也可以使用配有红色滤镜的安全灯，但安全灯到工作面的距离至少要有 1.2 m。

（2）清洗所有用于盛放乳胶溶液的塑料和玻璃器皿，确保器皿上不沾有陈旧的乳胶溶液。

（3）水浴箱加热到 42℃。确保水位线达到乳胶溶液的上缘。用铝箔遮蔽红灯，以避免照射到水浴箱。在此过程中不要拔掉水浴箱的电源以免产生电火花。

（4）准备铝箔、透明胶带、Kleenex 面纸、手套和干燥剂。

（5）准备木制片架用于干燥切片。将木架放入聚苯乙烯泡沫塑料盒中，以便在避光条件下干燥切片（盖上聚苯乙烯泡沫塑料盒的盖子并置于黑色塑料垃圾袋内）。

（6）准备黑色的小载玻片盒（10 张或 25 张切片），用于避光保存已包被的玻片。在 Kleenex 面纸内包入干燥剂（硫酸钙）并置于两张空白的玻片中间，然后固定于盒内。关闭片盒，直到欲将乳胶溶液包被的玻片置入盒内时再打开。

（7）按顺序排列载玻片，让标本位于所有载玻片的同一侧，确保在黑暗中能将乳胶溶液涂在载玻片正确的一面。

3.4.2 制备乳胶溶液的储备液

（1）将盛有蒸馏水的烧杯在水浴中加热至 42℃，确保水位线达到乳胶溶液的上缘。

（2）在 20 ml 的位置对每个 Lab-Tek 载玻片盒进行标记。

（3）每个 Lab-Tek 载玻片盒内加入 10 ml 蒸馏水。

（4）关闭除了安全灯以外的所有灯光。

（5）用干净的药匙向每个 Lab-Tek 载玻片盒内加入冷乳胶溶液至 20 ml 的水平线（即 10 ml 乳胶溶液）。

（6）将每个 Lab-Tek 载玻片盒外面包上两层铝箔以保持其中的乳胶溶液避光。将乳胶溶液保存于 4℃，远离所有放射源。最好放置于干净的铅盒内。

3.4.3 乳胶溶液的准备

（1）按照前述方法准备暗室。

（2）加热乳胶溶液到 42℃。确保水浴箱的水位线达到乳胶溶液的上缘。保持铝箔的位置不变以避免曝光。

3.4.4 用乳胶溶液包被

（1）在黑暗中去除铝箔。

（2）轻轻混匀乳胶溶液，避免产生气泡，乳胶溶液必须一直保持在水浴箱中。

（3）用一张玻片检验乳胶溶液以确保乳胶溶液混合均匀。

（4）将玻片浸入乳胶溶液中两次，动作要慢而正规，且浸入速度要相同（可以通过计数的方法确保速度相同）以保证玻片上的乳胶溶液厚度均匀。用 Kleenex 面纸将玻片背面的乳胶溶液擦干。

（5）到室外检查一张空白玻片上乳胶溶液的均匀度。确保不要有光线进入暗室。

（6）一张接一张地将乳胶溶液加于每张玻片上。

（7）将玻片垂直置于木制片架上，磨砂端位于木架的裂缝内。

（8）盖上聚苯乙烯泡沫塑料盒的盖子并置于塑料袋内。

（9）室温下干燥 1～3 h。

（10）将玻片移入盛有干燥剂的黑色载玻片盒内。用铝箔包裹玻片盒后，置于黑色厚塑料袋内。4℃保存直到显影（7 d 或 14 d），并远离所有放射源。

（11）清理暗室和乳胶溶液容器。

3.4.5 乳胶溶液的显影

（1）加热载玻片盒和其中的溶液到室温（至少 30 min）。

（2）配制下述溶液：将 Kodak Dektol 储备显影液按 1∶1 的比例用蒸馏水稀释；将储备定影液按 1∶3 的比例用蒸馏水稀释。分别取 200 ml 上述液体置于不同的染色盘内。

（3）关闭暗室灯光。

（4）按下述溶液的顺序依次浸泡玻片：显影液 8 min；清水 30 s；定影液 4 min；定影液 4 min。打开暗室的灯光，流水冲洗（或每 5 min 换水）30 min，固体封片剂封片（如 3.5. 所述），落射荧光显微镜下观察。图 12.1 为标记保留细胞（图 12.1A）和角蛋白 19（图 12.1B）的双标记结果［见注意事项（5）］。

3.5 角蛋白 19 的单一免疫荧光染色

本部分描述的间接免疫荧光染色法可用于检测小鼠和人组织，以及分离培养细胞的角蛋白 19 的表达情况[3]。同样的方法可用于检测角蛋白 18 和角蛋白 20。角蛋白 18 和角蛋白 20 是用于评估麦克尔（Merkel）细胞亚群的有用标记，该亚群细胞也可共表达角蛋白 19[6]。

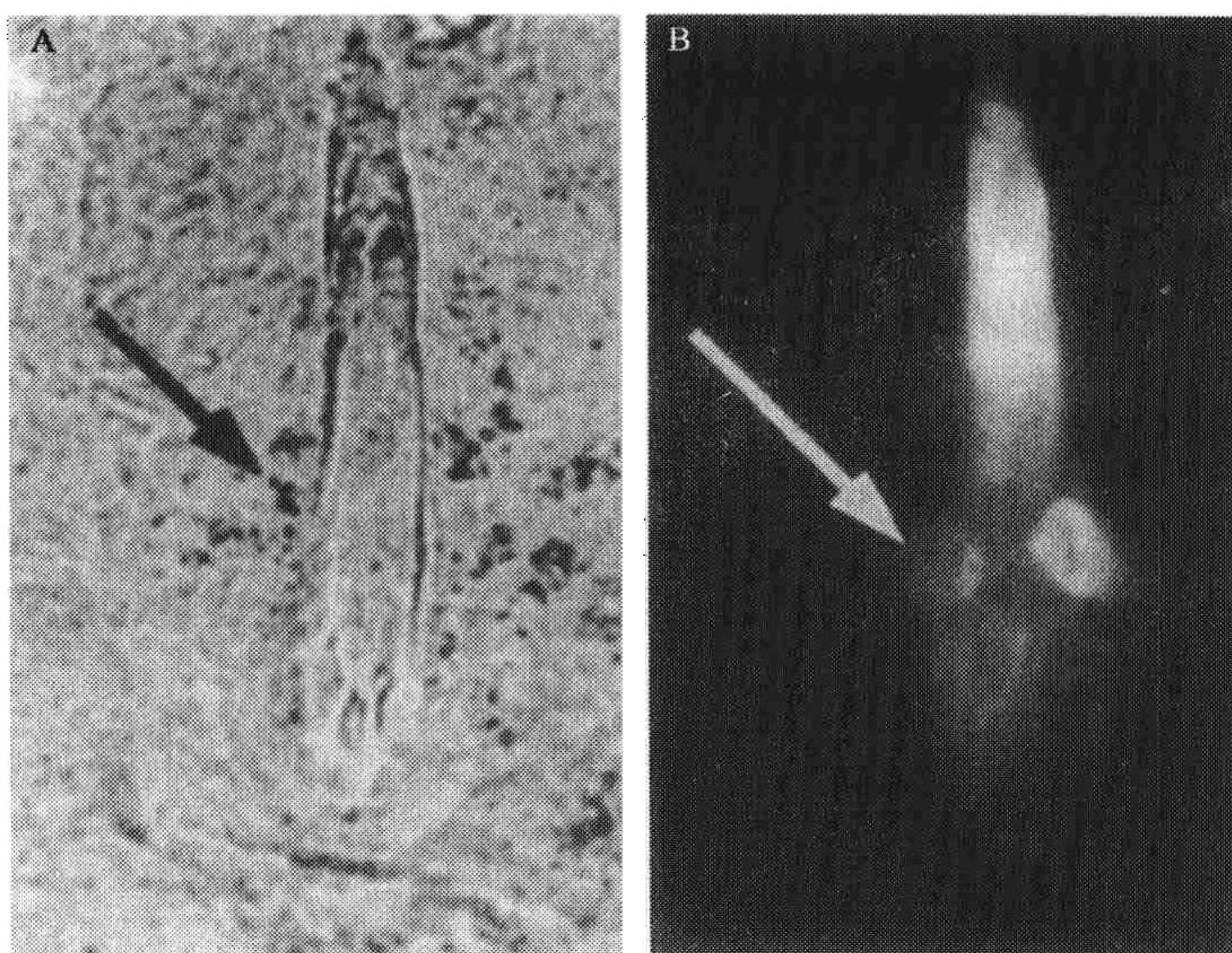


图 12.1　皮肤组织内标记保留细胞（A）和角蛋白 19（B）双标记

3.5.1　组织切片

对于组织切片，按 3.3 的步骤（1）～（7）进行操作，再按 3.5.3 和 3.5.4 的步骤进行操作。

3.5.2　细胞

细胞内的角蛋白免疫荧光染色需要将培养在塑料培养皿或玻璃盖玻片上的角质形成细胞在−20℃下用乙醇固定 10 min。然后按 3.3 的步骤（1）～（7）进行操作，再按 3.5.3 和 3.5.4 的步骤进行操作。

3.5.3　Hoechst 复染

（1）切片或细胞可以按下述方法用 Hoechst 溶液（细胞核染料）复染：蒸馏水内清洗 2 min：将玻片放入片架并浸入蒸馏水内洗两次，小心操作以免脱片。

（2）每张玻片上滴加 25～50 μl Hoechst 溶液（0.05 g Hoechst 33258 溶解于 1 L 蒸馏水中制成）。

（3）保留 Hoechst，避光孵育 10 min。

（4）蒸馏水内清洗 2 min：将玻片放入片架并浸入蒸馏水内洗 3 次。小心操作以免脱片。

3.5.4　封片

（1）温水中或微波加热固体封片剂使之液化。注意不要让封片剂温度过高以免破坏切片。

（2）对于组织切片，每张载玻片上滴加一滴封片剂。

（3）轻轻盖上一张盖玻片，避免产生气泡。

（4）对于盖玻片上的细胞：取一张载玻片，在载玻片上滴加一滴封片剂。
（5）将带有细胞的盖玻片轻轻盖在封片剂上，避免产生气泡。
（6）用 Kleenex 面纸擦去多余的封片剂。
（7）4℃避光保存，避免荧光漂白。
在配备落射荧光检测装置的显微镜（如 Nikon Optiphot）下观察切片。

3.6 流式细胞术分析

此方法是一种对悬浮细胞进行免疫荧光染色并用流式细胞仪对大量的悬浮细胞进行分析的方法。为了检测角蛋白 19，细胞必须固定并让抗体能穿透细胞膜，因为角蛋白 19 是一种胞质蛋白。

（1）将新鲜分离的细胞进行计数，离心（300 *g*，10 min）。把接近铺满的培养细胞用胰蛋白酶消化，计数，离心（300 *g*，10 min）。

（2）细胞以 1×10^6 个/100 μl 的浓度重悬于 4℃的盐水。

（3）准备带盖的 15 ml 离心管并加入－20℃的 70%乙醇 4.5 ml。固定细胞：用微量吸管将 500 μl 细胞悬液加入冷乙醇内。注意每毫升乙醇内的细胞不能多于 1×10^6 个，以避免细胞发生聚集。

（4）－20℃下固定 30 min。－20℃下保存备用。

（5）免疫荧光标记过程在 15 ml 圆锥形试管内进行。2 ml 的 PBS-BSA 中加入 4×10^5 个细胞（第一次清洗）。

（6）清洗：加 2 ml 的 PBS-BSA。离心（300 *g*，7 min），弃上清。

（7）2 ml 的 PBS-BSA 再次清洗。

（8）加入一抗孵育。向试管内加入 40 μl 用 PBS-BSA 稀释好的一抗并吹散细胞，向对照管内加入 40 μl PBS-BSA 或无关抗体。每 10 min 用手振动试管以重悬细胞。室温下孵育 45 min。

（9）用 2 ml 的 PBS-BSA 清洗三遍，再加入 2 ml 的 PBS-BSA。离心（300 *g*，7 min），弃上清。

（10）加入二抗并孵育。向试管内加入 40～70 μl 用 PBS-BSA 稀释好的二抗并吹散细胞，每 10 min 用手振动试管以重悬细胞。室温下孵育 30 min。

（11）用 2 ml 的 PBS-BSA 清洗三遍。

（12）重悬细胞，终体积为 200 μl。转移至更小的试管（如 Falcon 2058）并立即用流式细胞仪（如 Becton－Dickinson FACScan®）检测。

（13）表格模式下按照前向散射（FSC）、侧向散射（SSC）和绿色荧光三个参数检测，每个样本需要采集至少 10 000 个细胞。FSC 设门于 200（任意单位）以排除假阳性的已分化细胞（用无关抗体如抗地高辛配基可获得一种可变的已分化角质形成细胞背景染色）。

（14）角蛋白 19 阳性细胞存在于小体积和中等体积的角质形成细胞群（相对未分化、FSC 更低）中，其百分率由如下步骤确定：在 FSC 门控（通道 0～200 内的细胞保留，而通道200～256 内的细胞予以排除）群体内的标记细胞群减去对照，用 Consort 30 程序覆盖直方图（Becton-Dickinson），并估计波峰或波肩下的细胞的比例。

4 注意事项

（1）5 倍浓度的 PBS 溶液可以配制并保存于 4℃，但不能加入 $CaCl_2$。$CaCl_2$ 只能在 PBS 被稀释成一倍浓度时才能加入。

（2）也可以配制 10 倍浓度的 PBS 溶液并保存于 4℃。

（3）成年小鼠（4 周龄的 SENCAR 小鼠）体内慢周期细胞的标记可以通过植入两个 Alzet 渗透性微型泵来进行。每个泵携带 200 μCi ［甲基-^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷，每天注入［甲基-^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷 10 μCi，总剂量为每只动物每天注入［甲基-^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷 20 μCi。标记连续进行 14 d，然后将泵去除，动物继续喂养4～8 周[8]。

（4）为了改善组织的黏附，玻璃载玻片可以用明胶处理（将玻片浸入 0.5%的明胶水溶液内然后取出晾干），或者使用 Superfrost 载玻片。

（5）根据需要决定是否复染。复染时注意不要掩盖荧光。

致　谢：作者感谢 LOEX 实验室那些对制订上述实验方法作出贡献的在职的和前任的成员。

（韩　冰 译　付小兵 校）

参 考 文 献

［1］Green, H., Kehinde, O., and Thomas, J. (1979) Growth of cultured human epidermal cells into a multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5665—5668.

［2］Germain, L., Rouabhia, M., Guignard, R., Carrier, L., Bouvard, V., and Auger, F. A. (1993) Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* **2**, 99—104.

［3］Germain, L., Michel, M., Fradette, J., Xu, W., Godbout, M-J., and Li, H. (1997) Skin stem cell identification and culture: a potential tool for rapid epidermal sheet production and grafting, in *Skin Substitute Production by Tissue Engineering: Clinical and Fundamental Applications*. (Rouabhia, M., ed.), Landes Bioscience, Austin, TX, pp. 177—210.

［4］Michel, M., Török, N., Godbout, M.-J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A. et al. (1996) Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J. Cell. Sci.* **109**, 1017—1028.

［5］Michel, M., L'Heureux, N., Auger, F. A., and Germain, L. (1997) From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age. *J. Cell Phys.* **171**, 179—189.

［6］Fradette, J., Larouche, D., Fugère, C., Guignard, R., Beauparlant, A., Couture, V., et al. (2003) Normal human Merkel cells are present in epidermal cell populations isolated and cultured from glabrous and hairy skin sites. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 313—317.

［7］Lussier, M., Ouellet, T., Lampron, C., Lapointe, L., and Royal, A. (1989) Mouse keratin 19: complete amino acid sequence and gene expression during development. *Gene* **85**, 435—444.

［8］Cotsarelis, G., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329—1337.

第三部分　表皮分化的分析

第13章　免疫定位技术在表皮研究中的应用

Tammy-Claire Troy，Ramtin Rahbar，Bilge Diker，Kursad Turksen

摘　要：免疫组织化学是定位特异性蛋白在表皮内相对表达区域的一种有效方法，可为确定这些蛋白质的功能提供证据。因此本章将介绍一种行之有效的表皮内的免疫定位技术。

关键词：免疫组织化学；表皮；分化；角蛋白；抗体

1　导言

免疫组织化学能够有效地定位特异蛋白在表皮中的相应表达位置，即基底层、基底上层和角质层。特定蛋白在表皮内的准确定位为阐明其在表皮中的功能提供了线索。在这一章，我们介绍一种可靠的表皮内免疫定位方法，此方法经改进后适用于在我们实验室常规应用的冰冻切片和石蜡切片[1,2]。通常石蜡切片形态保持较好，因此能够得到更好的结果和更优质的照片。然而，不是所有抗体都适合石蜡切片过程中粗略的固定方法和处理过程，因此，本章还包括冰冻切片的实验方案。在石蜡切片中，将介绍两种组织固定技术（Bouin 和多聚甲醛）；固定剂的选择直接与抗体的特性相关，也许还需要其他固定方法。

2　材料

2.1　组织标本切片制备

2.1.1　小鼠解剖

（1）电动剃须刀（如市面上的 Braun、Phillips 或者 Remington 等品牌）。

（2）解剖工具：5 号 Dumont 尖头镊（Fine Science Tools，North Vancouver，Canada；cat. no. 11251-30），眼科直剪（Fine Science Tools；cat. no. 14094-11）。

（3）纸巾（brown；Grand & Toy，Toronto，Canada；cat. no. WW405306）。

2.1.2　标本固定和石蜡块制备

（1）饱和苦味酸（Sigma-Alderich，Oakville，Canada；cat. no. 925-40）。

（2）甲醛溶液（Fisher Scientific，Nepean，Canada；cat. no. F79-500）。

（3）冰醋酸（Fisher；cat. no. A38-500）。

（4）Bouin 固定液［见注意事项（1）］：37.5 ml 饱和苦味酸、10 ml 甲醛和 2.5 ml

冰醋酸，配制 50 ml，室温下使用。

(5) 多聚甲醛（Fisher；cat. no. 04042-500）。

(6) 0.1 mol/L NaOH。配制 100 ml，即将 0.4 g NaOH 溶于 100 ml 水中。

(7) 10×磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）。配制 1 L：取 11.5 g Na_2HPO_4 和 2.0 g KH_2PO_4 溶于 700 ml 水；再加入 80 g NaCl 和 2.0 g KCl；最后加水至 1 L。

(8) 50 ml Falcon 管（VWR International，Mississauga，Canada；cat. no. 21008-940）。

(9) 4%多聚甲醛 [见注意事项 (1)]。用搅拌器/加热平板和搅拌子，在通风橱内将 65 ml 水加热至 65℃。加入 4 g 多聚甲醛，搅拌，再加入 0.1 mol/L NaOH 60 μl 后搅拌溶液直至澄清。从加热平板上移开。加入 10×PBS 10 ml，最后加水定容至 100 ml。充分混合，装入两支 50 ml Falcon 管；冰浴冷却至少 20 min。

(10) 17 支 100 mm 聚丙烯无菌培养管（Fisher Scientific，Nepean，Canada；cat. no. 14-956-1J）。

(11) 封口膜（VWR；cat. no. 52858-000）。

(12) 振荡器（如：Hoefer RedRocker model no. pR50-115V；Hoefer Scientific Instruments，San Francisco，CA）。

(13) 1×PBS [用 10×PBS 稀释而得；见 2.1.2 的 (7)]。

(14) 30%、50%、70%、90%和 100%乙醇。

(15) 甲苯（Fisher；cat. no. T323-4）。

(16) 包埋盒（Fisher；cat. no. 15-182-500）。

(17) Superfrost 玻璃载玻片（Fisher；cat. no. 12-550-15）。

2.1.3 冰冻切片

(1) 异戊烷（二甲基丁烷，Fisher；cat. no. 03551-4）。

(2) 广口容器（如热水瓶）。

(3) 干冰。

(4) 24 mm×24 mm×5 mm 冷冻模具（Fisher；cat. no. 22-038-218）。

(5) 冰冻标本包埋液（Fisher；cat. no. 28-600-51）。

(6) 5 号 Dumont 尖头镊（Fine Science Tools，North Vancouver，Canada；cat. no. 11251-30）。

(7) 8 in 有齿镊（VWR；cat. no. 25607-120）。

(8) 铝箔。

(9) 可密封的塑料容器（如 Rubbermaid container）。

(10) Superfrost 显微镜载玻片（Fisher；cat. no. 12-550-15）。

(11) 载玻片盒（Fisher；cat. no. 03-488-10）。

(12) 封口膜（VWR；cat. no. 52858-000）。

2.2 免疫定位

2.2.1 石蜡切片脱蜡

(1) 带金属手柄（Fisher；cat. no. 08-812-1C）的玻片架（Fisher；cat. no. 08-812-1C）。

(2) 杂交炉升温直至 50℃。

(3) 铝箔。

(4) 带盖的染色缸（Fisher；cat. no. 08-812-1A）。

(5) 甲苯（Fisher；cat. no. T323-4）。

(6) 100%、95%和 70%乙醇。

(7) 枸橼酸钠二水化物（Fisher；cat. no. S279-500）。

(8) 枸橼酸一水化物（Fisher；cat. no. A104-500）。

(9) 1×枸橼酸盐缓冲液（用 10×溶液稀释获得）。配制 10×溶液：24.1 g 枸橼酸钠二水化物，3.78 g 枸橼酸一水化物，加入 900 ml 水中。高压灭菌后室温保存 [见注意事项（2)]。

(10) 聚丙烯烧杯（1 L）（Fisher；cat. no. 02-591-17E）。

(11) 微波炉。

(12) 1×PBS [可以用 10×PBS 稀释而得；见 2.1.2. 的（7)]。

2.2.2 冰冻切片固定

(1) 带金属手柄（Fisher；cat. no. 08-812-1C）的玻片架（Fisher；cat. no. 08-812-1C）。

(2) 带盖的染色缸（Fisher；cat. no. 08-812-1A）。

(3) 甲醇（−20℃）（Fisher；cat. no. A452SK-4）。

(4) 1×PBS [用 10×PBS 稀释而得；见 2.1.2 的（7)]。

2.2.3 苏木精伊红染色（H. E.）

(1) 具有金属手柄（Fisher；cat. no. 08-812-1C）的玻片架（Fisher；cat. no. 08-812-1C）。

(2) 带盖的染色缸（Fisher；cat. no. 08-812-1A）

(3) Shandon 速溶苏木精（Fisher；cat. no. 68-601-02）。配制储存液：将 A 瓶加入 800 ml 水中，混匀，然后加入 B 瓶。室温，避光保存两周。

(4) 苏木精（工作液）：按照 1∶3 的比例稀释储存液。配制 450 ml 工作液即将 150 ml 储存液加入 300 ml 水中 [见注意事项（3)]。

(5) 80%、95%和 100%乙醇。

(6) 冰醋酸（Fisher；cat. no. A38-500）。

(7) 伊红（Fisher；cat. no. E-511）。

(8) 伊红储存液：10 g 伊红溶解于 100 ml 水中，再加入 95%乙醇 800 ml。

(9) 伊红工作液：伊红储存液 200 ml 与 80%乙醇 600 ml 混合，加入 4 ml 冰醋酸。

(10) 甲苯（Fisher；cat. no. T323-4）。

(11) Permount 封片剂（Fisher；cat. no. SP15-100）。

(12) 盖玻片（22 mm×50 mm）（Fisherfinest™ Premium，Fisher；cat. no. 12-548-5E）。

2.2.4 免疫染色

(1) PAP 笔（The Binding Site，Birmingham，UK；cat. no. AD100. 1）。

(2) 15 cm 耐热玻璃盘（Pyrex dish，Fisher；cat. no. 08-747F）。

(3) 滤纸（Fisher；cat. no. 09-801D）。

(4) 湿化盒［见注意事项（4）］。

(5) 1×PBS［用 10×PBS 稀释而得；见 2. 1. 2 的（7）］。

(6) 牛血清白蛋白组分 V（BSA，fraction V，Sigma；cat. no. A-9647）。

(7) 明胶（IGSS quality；Amersham Biosciences，Baie d'Urfé，Canada；cat. no. RPN416V）。

(8) 配制 1 L 洗涤缓冲液：8 g BSA 溶于 50 ml 1×PBS 中，加入 1×PBS 直至 1 L，最后加入 1 ml 明胶。

(9) 山羊血清（Invitrogen，Burlington，Canada；cat. no. 16210-064）。热灭活：将血清瓶置于 4℃过夜解冻，57℃水浴中持续混匀 7 min，继续孵育 30 min，偶尔混匀。分装，−20℃保存。

(10) 配制 1 ml 封闭缓冲液：热灭活山羊血清 50 μl 加入 950 μl 洗涤缓冲液。

(11) 具有金属手柄（Fisher；cat. no. 08-812-1C）的玻片架（Fisher；cat. no. 08-812-1C）。

(12) 带盖的染色缸（Fisher；cat. no. 08-812-1A）。

(13) 配制 1 ml 孵育缓冲液：热灭活山羊血清 10 μl 加入 990 μl 漂洗缓冲液。

(14) 第一抗体和第二抗体（市场购买或者常规制备）。

(15) Mowiol 4-88 (Polysciences Inc. ; cat. no. 17951)。

(16) 甘油（Fisher；cat. no. BP229-1）。

(17) 0. 2 mol/L Tris-HCl，pH 8. 5。配制 100 ml：2. 42 g Tris 溶解于 70 ml 水，用 HCl 调整 pH 到 8. 5，加水定容至 100 ml。高压灭菌后室温保存。

(18) 50 ml Falcon 管（VWR International，Mississauga，Canada；cat. no. 21008-940）。

(19) 50℃水浴。

(20) 一次性 10 ml 吸管（Fisher；cat. no. 13-678-11E）。

(21) Nalgene 离心管（Fisher；cat. no. 05-562-14D）。

(22) 1，4-重氮二环（2，2，2）辛烷（DABCO）（Sigma；cat. no. D-2522）。

(23) 配制 20 ml Mowiol⁺：2. 4 g Mowiol 4-88 加入 6 g 甘油中，室温下搅拌 2 h，加入 6 ml 蒸馏水后，室温下继续搅拌数小时。加入 12 ml 0. 2 mol/L Tris-HCl pH 8. 5，加热直至 50℃，持续 10 min，不时混匀。用一次性吸管将溶液移至 Nalgene 离心管，

5000 *g* 离心 15 min。将离心好的溶液移至新的离心管，加入 2.5%DABCO 抗退色剂，搅拌至溶解。按 1 ml 分装备用，−20℃保存。需用时，解冻离心管，在 4℃可以保存数周。

(24) 盖玻片 (22 mm×50 mm) (Fisherfinest™ Premium，Fisher；cat. no. 12-548-5E)。

3 方法

3.1 组织标本切片的制备

3.1.1 小鼠解剖

(1) 使用电动剃刀，轻柔地剃去小鼠背部取皮区的毛发 [见注意事项 (5)]。

(2) 按照《动物关怀指南》处死小鼠。操作要迅速，以尽量减少组织损伤，取皮，轻柔地铺平于纸巾上 [见注意事项 (6)]。如果有需要，可以修剪皮肤边缘的纸巾，将组织切成适合处理的组织片。直接固定 (见 3.1.2) 或者冷冻 (见 3.1.3)。

3.1.2 固定和石蜡块制备

(1) 固定前准备好 Bouin 溶液，或者 4%多聚甲醛固定液。加 15 ml 固定液到贴有标签的聚丙烯培养管中。

(2) 将组织浸入适当的固定液，盖好管盖，用封口膜密封管口。将培养管放在振荡器上，振荡孵育过夜 [见注意事项 (8)]。用 Bouin 溶液固定时在室温下孵育即可，而 4%多聚甲醛固定液需要在 4℃孵育。

(3) 固定完成后，室温下用 1×PBS 漂洗数次。

(4) 室温下用一系列浓度的乙醇对样品进行漂洗脱水：① 30%，2×30 min，每次 15 ml；② 50%，2×30 min，每次 15 ml；③ 70%，2×30 min，每次 15 ml。

(5) 最后一次漂洗后，更换新的 70%乙醇 15 ml。4℃下样品可以在其中保存，直到进行石蜡切片。

(6) 在用石蜡包埋前，样品要进一步脱水：① 90%乙醇，2×30 min，每次 15 ml；② 100%乙醇，2×30 min，每次 15 ml。

(7) 已脱水组织用甲苯漂洗 2×30 min，然后放入包埋盒，用 56℃石蜡浸泡 30 min [见注意事项 (9)] 以浸透组织。

(8) 石蜡块制作应当保证组织块位置合适 [见注意事项 (10) 和 (11)]。切片的理想厚度为 7～10 μm，然后裱于载玻片上 [见注意事项 (12)]。切好的载玻片切片和没有切的石蜡块可以保存在室温下，以备将来使用。

3.1.3 冰冻切片块的制备

(1) 将异戊烷倒入广口容器，加入干冰使其冷却 [见注意事项 (13)]。

(2) 在一平台上，给冰冻模具灌满冰冻包埋液，再用镊子将皮肤组织安放在包埋液中。

（3）用有齿镊立即将冰冻模具放入已经冷却的异戊烷中保持 30 s，直到变成冰块［见注意事项（14）］。

（4）从冰冻模具中取出已冰冻的组织块，用铝箔包好，然后放置在一个密封的塑料容器中储存，−20℃保存，直到切片［见注意事项（15）］。

（5）在−25℃下，将组织切成 7～10 μm 厚的切片，然后裱在载玻片上［见注意事项（12）］。切好的切片可以保存在用封口膜密封好的切片盒里，温度为−20℃［见注意事项（15）］。

3.2 免疫定位［见注意事项（16）］

3.2.1 石蜡切片脱蜡

（1）将切片放置在一个切片架上，用铝箔包裹，50℃孵育 15 min［见注意事项（17）］。

（2）迅速从铝箔中取出切片架，用甲苯孵育三次，每次 5 min［见注意事项（18）］。甲苯处理后，用 100%乙醇短暂漂洗切片，然后进行下一步操作［见注意事项（19）］。

（3）100%乙醇孵育，更换溶液三次，每次洗 5 min。

（4）标本的水化：①95%乙醇，5 min；②70%乙醇，5 min；③水，2×5 min。之后直接进行 H.E 染色（见 3.2.3），或者接下来按下述步骤进行免疫组化染色（见 3.2.4）。

（5）在 1 L 体积的塑料烧杯中盛 1×枸橼酸盐缓冲液 500 ml，浸入切片架（无金属柄）。微波炉高功率 2×5 min［见注意事项（20）］。

（6）将切片架转移到盛有温热自来水的染色缸中放置 5 min，以逐渐降低工作温度。

（7）用 1×PBS 缓冲液孵育切片，更换溶液三次，每次 5 min。.

（8）接下来直接进行免疫染色［见 3.2.4 和注意事项（21）］。

3.2.2 冰冻切片固定

（1）将切片从−20℃中取出，放置在切片架上，室温下放置 5 min［见注意事项（22）］。

（2）将切片放置在−20℃的冷 100%甲醇中固定 10 min［见注意事项（23）］。

（3）室温下用 1×PBS 漂洗切片 3×5 min。

（4）直接做 H.E 染色（见 3.2.3）或者免疫组化染色［见 3.2.4；见注意事项（24）］。

3.2.3 H.E 染色［见注意事项（25）］

（1）切片在苏木精工作液中染色 2 min［见注意事项（3）］，用水漂洗 5 min。

（2）切片在伊红工作液中染色 3 min［见注意事项（3）］。

（3）用 95%乙醇漂洗两次，每次 2 min；然后用 100%乙醇漂洗两次，每次 2 min。

（4）甲苯孵育 2×2 min。去除多余的甲苯，每张切片滴几滴封片剂封片，再盖上

盖玻片［见注意事项（26)］。

3.2.4 免疫组织化学

（1）从 PBS 中取出切片，用纸巾将标本周围的玻片擦干［见注意事项（27)］。然后用 PAP 笔画出标本的区域，以防标本之间的抗体交叉污染。

（2）将切片放入湿化盒［见注意事项（4)］，用 100 μl 封闭液孵育 30 min［见注意事项（28）和（29)］。

（3）将切片转移到玻片架，用洗涤缓冲液漂洗 5 min。

（4）吸干标本周围过多的洗涤缓冲液［见注意事项（27)］，然后将切片放回湿化盒。用合适的第一抗体稀释液约 50 μl 室温孵育切片 1 h［见注意事项（28)～(30)］。

（5）将切片放回玻片架，用洗涤缓冲液洗三次，每次 10 min。

（6）吸去标本周围过多的洗涤缓冲液［见注意事项（27)］，用合适的第二抗体稀释液 50 μl 覆盖标本，湿化盒内室温孵育 1 h［见注意事项（28)～(30)］。

（7）用洗涤缓冲液漂洗三次，每次 15 min。

（8）1×PBS 洗三次，每次 5 min。

（9）吸干标本周围的液体［见注意事项（27)］，擦干切片背面的 PBS，加上 60 μl $Mowiol^{+}$ 到切片上，小心盖上盖玻片［见注意事项（31)］。

4 注意事项

（1）固定液应当用一次性的或者指定的塑料和玻璃器皿。

（2）10×枸橼酸盐缓冲液容易污染，因此有必要在开始实验前对其进行检查。

（3）染色溶液应新鲜配制，为了确保染色质量，最多可染色 30 张切片，一周内用完。

（4）将浸湿的滤纸放在 15 cm 玻璃平皿中，盖上盖子，就制成了一个湿化盒。

（5）电动剃刀相对其他一次性使用的剃刀或者刀片而言，对皮肤组织损伤最小，但是不推荐上蜡，因为会擦伤皮肤。

（6）将皮肤铺放在纸巾上能够防止皮肤卷曲。

（7）为了能够完全均匀固定和易于切片，组织块不应大于 1 cm^2。

（8）应固定 16～18 h；不推荐更短或者更长的固定时间。

（9）如果石蜡太烫或者孵育时间太长，组织的抗原性可能会变弱。

（10）应当注意皮肤切片时的方向定位，这样切出来的切片可以显示完整的毛囊（从顶端到毛球部），或者局部结构（显示所有同心圆层）。

（11）如果组织在石蜡块内的方向不好，可以将石蜡块熔化，再重新包埋组织。

（12）Superfrost Plus 载玻片的静电表面保证了组织贴附在玻片上，而不致折叠或者起皱。

（13）泡沫停止产生时的温度正好。

（14）随着冷冻温度的降低，包埋液可以从透明液体变成不透明的白色固体。

（15）我们发现在－20℃长期保存下并不能保证组织的完整性，因此不推荐保存时

间超过两周。

(16) 下列步骤是将切片放在玻片架上并在带盖的方形染色缸中的溶液里进行的。在你的实验室也可以设置一个免疫定位染色的工作台，并配备针对所有类型溶液的独立染色缸。这样可以最大限度地减少设施，节省时间。除了枸橼酸盐缓冲液、PBS和洗涤缓冲液必须每天现用现配外，其他溶液只需每天染色前简单换一下即可。

(17) 为了在50℃进行孵育，我们使用前至少将杂交炉开启1 h以上。

(18) 这一步骤应当在通风橱中进行，因为甲苯蒸汽对人体有害。

(19) 在乙醇中漂洗会形成白色沉淀。

(20) 在孵育间隙，短暂开启炉门使炉冷却。

(21) 石蜡切片没有冰冻切片那么脆弱，因此可以稍微用力漂洗和甩干玻片。

(22) 将载玻片回复到室温可以增加组织片对玻璃的黏附力。

(23) 将一瓶500 ml甲醇和一个染色缸保存在－20℃。

(24) 冰冻切片应当比石蜡切片更轻柔地处理，因为它们更加容易折叠或者从玻片上脱落。因此所有的漂洗工作都要非常轻柔，应力求避免用甩片的方法去掉玻片上多余的液体。

(25) 为了降低采用不合格切片带来的费用，在继续进行免疫组化染色之前，推荐每个标本先做一张玻片染色以查证组织的完整性和方向性。

(26) 尽量不要用太多封片剂，以避免其从盖玻片边缘溢出损害显微镜台。让封片剂在室温下放置至少1 h，待其硬化，然后再观察切片。

(27) 小心不要接触标本。

(28) 为了防止载玻片变干，操作要迅速，擦去其多余的液体后立即用封闭缓冲液/抗体处理。

(29) 确定切片完全被覆盖，这样在孵育期间不会变干，变干会增加背景干扰。

(30) 孵育温度和时间根据抗体不同而有所变化。请参考抗体说明书，看是否有特殊要求。

(31) 在载玻片上放盖玻片时要慢，尽量减少标本和盖玻片之间的气泡产生。

致　谢：本实验工作由加拿大健康研究院（CIHR）的基金资助。感谢渥太华医院的Mr. Peter Ripstein MLT.、ART.、Mr. William Parks MLT. 和 Ms. Josephine Urbisci MLT.，感谢他们多年来不懈的技术支持。

（张教扬 译　伍津津 校）

参考文献

[1] Turksen, K. and Troy, T. C. (2003) Overexpression of the calcium sensing receptor accelerates epidermal differentiation and permeability barrier formation in vivo. *Mech. Dev.* **120**, 733—744.

[2] Turksen, K. and Troy, T. C. (2002) Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressingclaudin 6. *Development* **129**, 1775—1784.

第14章 以逆转录聚合酶链反应分析表皮细胞

Tammol/Ly-Claire Troy, Robert Man-Kit Cheung, Kursad Turksen

摘 要：逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）常用于表皮基因表达的半定量分析，尤其是对新发现的基因，由于缺乏相应的抗体而不能对其进行免疫定位时。因此，本章主要描述一种可靠的将逆转录聚合酶链反应用于分析基因在体内和体外表达的方法。
关键词：核糖核酸；基因表达；逆转录聚合酶链反应；表皮细胞；细胞分化

1 导言

人们乐于采用逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）对表皮的基因表达进行分析是因为该方法为基因表达水平提供了一种有价值的整体感知，尤其是不能获得新基因的相应抗体时。我们采用逆转录聚合酶链反应非常成功地对表皮的体内外基因表达进行了分析[1,2]。本章的实验方案描述了我们常规使用的 RT-PCR 方法。

2 材料

2.1 RNA 提取［见注意事项（1）］

2.1.1 培养细胞的 RNA 提取

（1）1×磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）：来自 10×PBS 的稀释液。制备 10×PBS（1 L）：溶解 11.5 g Na_2HPO_4 和 2.0 g KH_2PO_4 于 700 ml H_2O 中，添加 80 g NaCl 和 2.0 g KCl，加 H_2O 定容至 1 L。

（2）TRIzol® 试剂（100 ml，Invitrogen，Burlington，Canada；cat. no. 15596-026）。

（3）细胞刮擦器（Falcon，VWR International，Mississauga，Canada；cat. no. 15621-010）。

（4）17 mm×100 mm 的聚丙烯无菌培养管（Fisher Scientific，Nepean，Canada；cat. no. 14-956-1J）。

（5）氯仿（500 ml，Sigma-Aldrich，Oakville，Canada；cat. no. C-2432）。

（6）石蜡封口膜（VWR；cat. no. 52858-000）。

（7）配有适当离心转子和适配器的高性能离心机（如 Beckman Coulter Avanti™ J-25I，Beckman Coulter，Mississauga，Canada）。

（8）异丙醇（500 ml，Fisher，cat. no. A416-500）。

（9）75%乙醇（−20℃），溶解在焦碳酸二乙酯水（DEPC-H_2O）中。

(10) 焦碳酸二乙酯水 (DEPC-H_2O): DEPC (5 ml, Sigma; cat. no. D-5758), 配制的浓度为 0.1% (V/V) DEPC-H_2O。

(11) 无 RNA 酶的微型管。

(12) −80℃冰箱。

2.1.2 从小鼠组织提取 RNA

除上面所列出的材料 [除了第 (3) 条] 外, 尚需下列各项材料。

(1) 解剖器械: 5 号细尖 Dumont 镊 (Fine Science Tools, NortVancouver, Canada; cat. no. 11251-30); 精细手术直剪 10.5 cm (Fine Science ToolscatNo. 14094-11)。

(2) 铝箔。

(3) 液氮。

(4) 8 号有齿镊 (VWR; cat. no. 25607-120)。

(5) 50 ml Falcon 管 (VWR; cat. no. 21008-940)。

(6) 75%乙醇 (室温) 稀释在 DEPC-H_2O 中。

(7) 匀浆器 (如 Polytron® System PT 1300D; Kinematica AG, Luzern, Switzerland)。

(8) 微量离心机 (4℃)。

2.2 提纯 RNA 样本 [见注意事项 (1)]

(1) 无 RNA 酶的微型管。

(2) DEPC-H_2O。

(3) 10×DNA 酶缓冲液: 200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4、20 mmol/L $MgCl_2$、500 mmol/L KCl。配制 100 ml: 混合 50 ml 1 mol/L KCl、2.0 ml[①] 1 mol/L $MgCl_2$、10 μl 明胶及 10 ml 2 mol/L[②] Tris-HCl pH 8.4 分装后−20℃保存。

(4) RNA 酶抑制剂 (20 U/μl, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA; cat. no. N808-0119)。

(5) DNA 酶 I (256 U/μl, Invitrogen, cat. no. 18047-019)。

(6) 饱和的苯酚溶液 (100 ml, Amresco, Solon, OH; cat. no. 0945-100ML)。

(7) 氯仿 (500 ml, Sigma; cat. no. C-2432)。

(8) 异戊醇 (500 ml, Fisher; cat. no. A393-500)。

(9) 3 mol/L 乙酸钠。将 24.6 g 乙酸钠溶解于 80 ml DEPC-H_2O 中, 加水定容至 100 ml。

(10) 无水乙醇 (−20℃)。

(11) 70%乙醇 (−20℃), 将无水乙醇稀释在 DEPC-H_2O 中。

2.3 RT-PCR [见注意事项 (1)]

(1) 微量反应管 (MicroAmp Reaction Tubes; Perkin-Elmer; cat. no. N801-0840)。

---

① 原文为 1.5 ml。——译者注

② 原文缺少浓度。——译者注

(2) 热循环控制仪（如 Thermocycler；Model 2400，Perkin Elmer；cat. no. 0993-6057）。

(3) DEPC-H_2O。

(4) 25 mmol/L $MgCl_2$（Perkin-Elmer，cat. no. N808-0010）。

(5) 10×PCR 缓冲液 II（Perkin-Elmer，cat. no. N808-0010）。

(6) 100 mmol/L dNTP 全套（Invitrogen；cat. no. 10297-018）。

(7) 10 mmol/L dNTP：用于逆转录（RT），把 dNTP 储存液用 DEPC-H_2O 作 1∶10 的稀释。

(8) RNA 酶抑制剂（20 U/μl，Perkin-Elmer；cat. no. N808-0119）。

(9) MuLV 逆转录酶（50 U/μl，Perkin-Elmer，cat. no. N808-0018）。

(10) 随机 6 核苷酸引物（50 μmol/L，Perkin-Elmer，cat. no. N808-0127）。

2.4 PCR

(1) 微量反应管（MicroAmp Reaction Tubes；Perkin-Elmer；cat. no. N801-0840）。

(2) 热循环控制仪（如 Thermocycler；model 2400，Perkin-Elmer；cat. no. 0993-6057）。

(3) 含有 15 mmol/L $MgCl_2$ 的 10×PCR 缓冲液，并一起提供 *Taq* 聚合酶。

(4) 100 mmol/L dNTP 全套（Invitrogen；cat. no. 10297-018）。

(5) PCR 所需 dNTP 浓度为 2.5 mmol/L。将每一种 dNTP 储存液（100 mmol/L）各 250 μl 组合在一个无菌微量管中并混匀（浓度为 25 mmol/L）。按 100 μl 的量分装到 10 个试管中，并添加 900 μl 无菌 H_2O 再混匀（浓度为 2.5 mmol/L）。

(6) 将 PCR 引物用无菌 H_2O 稀释至 25pmol/μl。

(7) *Taq* 聚合酶（5U/μl，Perkin-Elmer，cat. no. N808-0160）。

(8) 用于凝胶电泳的琼脂糖凝胶装置和试剂（琼脂糖、TBE 和溴化乙锭）。

3 方法

3.1 RNA 提取［见注意事项（1）］

3.1.1 从培养细胞中提取 RNA［见注意事项（2）和（3）］

(1) 弃去培养基并用 1×PBS 冲洗细胞 3 次。添加 TRIzol®（每个 35 mm 培养皿加 1 ml；每个 60 mm 培养皿加 3 ml；每个 100 mm 培养皿加 6 ml）在组织培养皿中溶解细胞［见注意事项（4）］。

(2) 用细胞刮擦器将细胞收集在 TRIzol® 中，并转移到无菌培养管中，室温孵育样本 5 min。

(3) 每毫升 TRIzol® 添加 0.2 ml 氯仿（即每个 35 mm 平皿用 200 μl；每个 60 mm 平皿用 600 μl；每个 100 mm 平皿用 1.2 ml）。将这些试管盖紧并剧烈振动 15 s，然后

室温孵育 3 min。在此过程中用石蜡封口膜代替试管盖，并将试管放在离心机的适配器中［见注意事项（5)］。

(4) 4℃ 12 000 *g* 离心 15 min［见注意事项（6)］。这时混合物将分成下层的苯酚：氯仿相界面，以及上层无色的水相［见注意事项（7)］。

(5) 将水相转移至新离心管中。按最初所用 TRIzol® 的量，每毫升加 0.5 ml 异丙醇（即每个 35 mm 平皿用 0.5 ml；每个 60 mm 平皿用 1.5 ml；每个 100 mm 平皿用 3 ml）用以沉淀 RNA。将这些试管盖紧并短时间涡旋混匀。室温孵育样本 10 min，用封口膜取代试管盖，把试管放在离心机的适配器中［见注意事项（5)］。

(6) 12 000 *g* 离心 10 min。在试管的底部及侧壁出现 RNA 片状沉淀物。

(7) 弃上清液并用无核糖核酸酶的75%乙醇（−20℃）清洗片状沉淀物。按最初所用 TRIzol® 的量，每毫升加 1 ml 乙醇（即每个 35 mm 平皿用 1 ml；每个 60 mm 平皿用 3 ml；每个 100 mm 平皿用 6 ml)。涡旋振摇混匀样本，7500 *g* 离心 5 min。

(8) 弃上清液，风干片状沉淀物。重新悬浮在 20～30 μl DEPC-H_2O 中［见注意事项（8)］。

(9) 读取 RNA 在 260 nm 与 280 nm 处的吸光度［见注意事项（9)］。用以下公式计算 RNA 的浓度：

$$[\mathrm{RNA}](\mu g/\mu l) = (A_{260} \times 40 \times \text{稀释系数})/1000$$

(10) 保存在−80℃。

3.1.2 从组织中提取 RNA

3.1.2.1 小鼠的组织剥离

(1) 在小鼠所需要的部位用电动剃刀剃去毛发［见注意事项（10)］。

(2) 按动物保护法规对小鼠实施安乐死。

(3) 迅速且精确地从小鼠中获取皮肤组织并用铝箔包裹。把皮肤组织切成 100～200 mg 的小片［见注意事项（11)］。用不褪色记号笔标记铝箔，然后用长的有齿镊将它浸没在一个装有液氮的容器里直到冻结（约 60 s)。

(4) 将包裹在铝箔里的冰冻组织转移至−80℃冰箱直到准备提取 RNA。

3.1.2.2 提取 RNA［见注意事项（1）～（3)］

(1) 彻底清洁匀浆器：用去离子水清洗三次，每次 10 s；用 70%乙醇清洗三次，每次 10 s；最后用 DEPC-H_2O 清洗三次，每次 10 s。用新纸巾拭去过量的水。

(2) 在无菌培养管中加入 4 ml TRIzol®，放在冰上，避光保存［见注意事项（4)］。

(3) 打开铝箔包并小心地将其内的组织块转移到盛有 TRIzol® 的试管中。立即标记试管以确保不发生组织块的混淆［见注意事项（12)］。

(4) 中等速度匀浆 60 s，或直到组织被充分匀浆［见注意事项（13)］。每个样本匀浆后，要确保匀浆器中没有残留的组织块，用纸巾擦拭干净匀浆器并按步骤（1）所述进行清洗［见注意事项（14)］。

(5) 每管加入 800 μl 氯仿（所用 TRIzol® 容量的 1/5)，盖紧并剧烈地振动 15 s，

室温孵育 3 min。在孵育期间，用石蜡封口膜取代试管盖，并放入离心机的适配器中[见注意事项（5）]。

（6）在 2～8℃ 12 000 *g* 离心 15 min [见注意事项（6）]。

（7）转移水相（清亮的上层）到已做标记的新培养管中 [见注意事项（7）]。每管添加 2 ml 异丙醇（所用 TRIzol® 容量的 1/2）。盖紧并短暂地涡旋混匀，室温孵育样本 10 min。孵育期间，可用封口膜代替试管盖并放入离心机的适配器中 [见注意事项（5）]。

（8）12 000 *g* 离心 10 min 以沉淀 RNA。

（9）小心地吸去上清液，用 1 ml 冰冷（－20℃）的 75%乙醇清洗片状沉淀物，然后转移到已标记的微量离心管中。再用 0.5 ml 冰冷（－20℃）的 75%乙醇清洗原培养管以确保转移了所有的 RNA。短暂涡旋混匀。

（10）4℃ 7500 *g* 离心 20 min。

（11）吸去乙醇并倒置微量离心管以风干片状沉淀物 15～30 min。

（12）将片状沉淀物溶解在 20～50 μl DEPC-H_2O 中 [当需要时；见注意事项（8）]。

（13）按 3.1.1 的第（9）步定量 RNA 并在－80℃保存样本。

3.2 去除 RNA 样本中的基因组 DNA [见注意事项（1）和（3）]

（1）消化 30～100 μg RNA 可配制 RNA 和 DEPC-H_2O 的总体积为 87 μl，再加入 10 μl 10×DNA 酶缓冲液、2 μl RNA 酶抑制剂和 1 μl DNA 酶 I。

（2）混匀并在室温下孵育 15 mim。

（3）制备氯仿∶异戊醇（24∶1）：在 50 ml Falcon 管内，加入 12 ml 氯仿和 0.5 ml 异戊醇 [见注意事项（15）]。

（4）添加等体积的苯酚∶氯仿到 RNA 样本中 [见注意事项（15）]。例如，100 μl 样本可加入 50 μl 苯酚及 50 μl 的氯仿∶异戊醇（24∶1）。

（5）上下倒置剧烈地混合直至形成乳浊液，室温下以最大速度离心 5 min。

（6）转移水相（上相）到一个新微量管中。

（7）对水相样本加入 1∶10 稀释的 3 mol/L NaAc。例如，100 μl 样本可添加 10 μl 3 mol/L NaAc。

（8）添加两倍体积的 100%乙醇（－20℃）来沉淀 RNA。例如，100 μl 样本添加 200 μl 100%乙醇。

（9）剧烈地混合，－80℃孵育 1 h。

（10）立即以最大速度在 4℃离心 20 min。

（11）用 200 μl 70%乙醇（无 RNA 酶，－20℃）冲洗片状沉淀物。

（12）4℃再次离心 10 min。

（13）风干片状沉淀物（约 15 min）之后，将其重悬于 DEPC-H_2O 中 [见注意事项（8）]。

（14）按 3.1.1 的第（9）步定量 RNA。

（15）用 DEPC-H_2O 稀释样本至 1 μg/μl 以便用于 RT-PCR 中，并保存在－80℃。

3.3 RT-PCR

3.3.1 RNA 的变性

（1）在 100 μl PCR 管中将 1 μl RNA 与 2 μl DEPC-H_2O 混合，涡旋摇匀数次。

（2）将 PCR 管放入 Perkin-Elmer 热循环控制仪，65℃处理 RNA 5 min，然后将温度保持在 4℃。此反应在进行 PCR 前必须在 4℃保持至少 5 min。

3.3.2 RT

（1）制备 RT 混合物：25 mmol/L $MgCl_2$（4 μl），10×PCR 缓冲液 II（2 μl），10 mmol/L 每种 dNTP（2 μl），RNA 酶抑制剂 1 μl，MuLV 逆转录酶 1 μl 及任意六聚物 1 μl。总共 17 μl。

（2）添加 17 μl RT 混合物到 3 μl 变性的 RNA 中并短暂摇匀。

（3）将 PCR 管放在热循环控制仪中运行，42℃ 15 min，99℃ 5 min，然后保持在 4℃。此反应在进行 PCR 前必须在 4℃保持至少 5 min。

3.3.3 PCR

（1）配制 PCR 反应混合物（最终容量为 50 μl）：0.5 μl 模板 DNA（约 10 ng），5.0 μl 2.5 mmol/L dNTP，5.0 μl 10×PCR 缓冲液（译者注：原文为 1.0 μl），1.0μl 3′端引物（25pmol/μl），1.0μl 5′端引物（25pmol/μl），0.5 μl *Taq* 聚合酶，37 μl dH_2O。

（2）按照下列条件在热循环控制仪中运行样本：

94℃，2 min
94℃，30 s ⎫
49℃，30 s[①] ⎬ 35 个循环
72℃，30 s ⎭
72℃，7 min
4℃，5 min
保持在 4℃

（3）在含有溴化乙锭的琼脂糖凝胶上对 PCR 样本进行电泳并分析结果，紫外线下观察。采用许多科研行业供应商公司提供的各种计算机软件程序可以评估条带的相对强度。

4 注意事项

（1）把 RNA 酶污染的风险降到最低的关键是提取 RNA 的操作过程中应使用无 RNA 酶的器械和溶液，以及经常更换手套。所用操作应使用无菌塑料器具和（或）烘烤过的玻璃制品，采用标明无 RNA 酶的化学试剂并用 DEPC-H_2O 配制所有的溶液。

---

① 延伸步骤的温度将有赖于所用的引物。

（2）下列的步骤来自制造商的操作说明。

（3）使用无 RNA 酶的条件和化学剂时应迅速操作以使 RNA 的降解减少至最低。

（4）应尽可能在通风橱中使用 TRIzol®，因为吸入这些蒸汽会有害健康。

（5）注意不要使用过量的石蜡封口膜；否则，这些试管可能被堵塞在离心机的适配器里。

（6）为了满足本实验方案中所描述的所有离心操作，离心机的运行温度应设置在 2～8℃。

（7）RNA 存在于水相中，大约占所加 TRIzol® 初始量的 60%。

（8）如果 RNA 片状沉淀物不易溶解，可在 55～60℃孵育 10 min。

（9）优质 RNA 的 A_{260} : A_{280} 值应为 1.6～2.0。

（10）与一次性剃刀或刀片相比，电动剃刀可使皮肤组织的损伤降到最低。

（11）大的冰冻组织块将难以匀浆。

（12）应注意一次仅处理一个样本直到 3.1.2.2 的第（5）步，这样可以使降解减少到最小。

（13）使用 Polytron® 匀浆器时，通常用最大速度的 60%就足够了。

（14）在继续下一步骤前，应将样本避光保存在冰上直到完成所有样本的匀浆。

（15）如果可能，尽量在通风橱中使用氯仿和苯酚，因为吸入这些物质有害于你的健康。

致　谢：加拿大自然科学和工程学委员会（NSERC）对这项工作给予的资助。

（王丽华 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Turksen, K., and Troy, T. C. (2002) Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* **129**, 1775—1784.

[2] Turksen, K. and Troy, T. C. (2003) Overexpression of the calcium sensing receptor accelerates epidermal differentiation and permeability barrier formation in vivo. *Mech. Dev.* **120**, 733—744.

第 15 章　表皮发育过程中基因诱导和屏障形成的全组织包埋分析

Carolyn Byrne, Matthew J. Hardman

摘　要：皮肤位于身体表面，是唯一可以用于分析全胚胎/胎儿发育变化的器官，如基因诱导、蛋白质表达、来源于表皮的附件（如毛囊）的形成，以及保护性屏障形成等方面的分析。这些分析一直强调皮肤发育的异源性。也许这并不让人吃惊，因为表皮的发育受到位于其下的异源性间充质组织的调控。因此，在对发育过程中的连续事件进行关联分析时（如基因表达的激活等），有必要通过精确的躯体位点匹配来解释这种异源性。本章介绍了为检测全组织包埋原位杂交和全组织包埋屏障形成所设计的实验操作规程。保护性屏障的形成是表皮终末分化的终点，在此过程中出现的缺陷可以表现为屏障形成的失败、加速或者延迟。因此，在基因修饰的生物体模型中，这些分析方法作为快速的初始检测，用以研究表皮发育的缺陷具有独特的价值。

关键词：全组织包埋原位杂交；基因诱导；染料渗透；屏障染料排除试验

1　导言

全组织包埋分析可应用于检测胚胎表皮的基因诱导、蛋白质表达及屏障功能，甚至到妊娠晚期的表皮组织，都不会遇到其他组织伴随的渗透难题。这种方法对研究皮肤和毛囊异源性所致的皮肤发育具有重要意义。当比较序贯性发育事件或者解释突变体/转基因表型时，必须充分考虑这种异源性。在这一章节中，我们主要讨论全组织包埋原位杂交的方法，这一方法是由用于胚胎/胎儿表皮分析的标准方案改进而来的。全组织包埋原位杂交技术与切片原位杂交技术相比，由于避免了杂交前对组织的直接操作及由此引起的细胞破坏和 RNA 降解，故其稳定性和敏感性更高。因而，本章描述的全组织包埋 RNA 分析技术可以通过杂交后切片对细胞水平的 RNA 进行高敏感度的检测。此外，本章也包括了对比全组织包埋 RNA 模式，以及最近文献报道的全组织包埋免疫组化技术的蛋白质定位方法。

表皮发育的结果就是保护性屏障的形成，因此，本章节中所介绍的全组织包埋屏障功能检测[1]有助于了解表皮发育过程中的缺陷，而且其作为快速筛查表皮发育变化的手段正逐步广泛应用于基因修饰的动物模型中。

2　材料

（1）转录缓冲液（5×或 10×）可随最商业化的 RNA 依赖性 DNA 聚合酶制剂获

得。典型的 1×转录缓冲液含有 40 mmol/L Tris-HCl（pH7.5）、10 mmol/L NaCl、6 mmol/L $MgCl_2$、1 mmol/L 亚精胺和 50 μg/ml BSA [2]。

（2）10×核苷酸标记混合物，用于制备 RNA 探针：将 10 mmol/L ATP、10 mmol/L CTP、10 mmol/L GTP、3.5 mmol/L UTP、6.5 mmol/L 半抗原标记的 UTP [如地高辛-11-UTP（Dig-11-UTP）、荧光素-12-UTP 和生物素-16-UTP（分别为 Roche Applied Sciences，Indianapolis，IN；cat. nos. 1209256、1427857、1388908）] 加入到 10 mmol/L Tris-HCl（pH7.6）中，或者购买预先混合的核苷酸 [如地高辛 RNA 标记混合物、荧光素 RNA 标记混合物或生物素 RNA 标记混合物（分别为 Roche Applied Sciences，Indianapolis，IN；cat. no. 1175025、1685619、1685597）]。

（3）用于制备 RNA 探针的酶类：T7、T3 或 SP6 RNA 聚合酶（可以从不同的公司购买，如 Promega，Madison，WI；cat. no. P2075、P2083、P1085）；核糖核酸酶抑制剂（如 Promega，Madison，WI；cat. no. N2611）。

（4）4 mol/L LiCl（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. L 9650）用于 RNA 沉淀：将 16.96 g 的 LiCl 溶解于 100 ml 焦碳酸二乙酯（DEPC）处理过的水中，然后分装并保存于－20℃。

（5）10×PBS 缓冲液 [见注意事项（1）]：每升中加入 80 g NaCl、2 g KCl、11.5 g Na_2HPO_4、2 g KH_2PO_4，用 NaOH 溶液将 pH 调至 7.4。

（6）1×PBST（含 Tween-20 的磷酸盐缓冲盐溶液）：1×PBS 中含有 0.1%的 Tween-20（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. P 1379）。

（7）蛋白酶 K 溶液用于增加胚胎/胎儿的通透性：为方便起见可以购买预先制备的溶液（如 Roche Applied Sciences，Indianapolis，IN；cat. no. 1373196）。

（8）2 mg/ml 甘氨酸（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. G 2879）：用于蛋白酶 K 的灭活，每次使用时都需用 DEPC 处理过的 1×PBST 新鲜制备 [见注意事项（1）]。

（9）含 4%多聚甲醛和 0.2%戊二醛的 PBS 用于胚胎组织经蛋白酶 K 处理后的再固定：将 DEPC 处理过的 PBS 液 [见注意事项（1）] 加热至 80～90℃，然后每 100 ml 溶液中加入 4 g 多聚甲醛（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. P 6148）。溶解多聚甲醛时需用加热搅拌器，加入几滴 1 mol/L NaOH 可以帮助溶解。冷却后，加入 50%戊二醛（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. G 7651，冰冻保存）并将整个混合液中戊二醛的浓度调整至 0.2%（如每 100 ml 加 0.4 ml 50%戊二醛）。

（10）用 1×PBST 新鲜配制的 0.1% 四氢化硼钠（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. S 9125）可封闭组织固定后的游离醛基。此溶液会产生气泡并释放出氢气，因此配制时试管盖不能拧紧。

（11）10×三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水 [TBS；见注意事项（2）]：每升中加入 80 g NaCl、2 g KCl 及 30 g Tris 碱，用 HCl 将 pH 调至 7.6。

（12）1×TBST [含 Tween-20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水；见注意事项（2）]：1×TBS 中含有 0.1%Tween-20。

（13）含 2 mmol/L 左旋咪唑（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. L 9756）的 1×TBST，当需要时用于抑制内源性碱性磷酸酶。

（14）10×PE 缓冲液：100 mmol/L PIPES（1，4-哌嗪二甲磺酸），pH 为 6.8；10

mmol/L EDTA。每升中加入 30 g PIPES (Sigma, St. Louis, MO; cat. no. P 6757) 和 3.7 g EDTA · Na_2，将 pH 调至 6.8。

(15) 杂交缓冲液：50%甲酰胺，1×PE 缓冲液，0.75 mol/L NaCl，1%十二烷基硫酸钠 (SDS)，0.05%肝素 (Sigma, St. Louis, MO; cat. no. H 3393)，100 μg/ml tRNA (Sigma, St. Louis, MO; cat. no. R 8759)，0.1%牛血清白蛋白 (New England Biolabs, Beverly, MA；可随购买限制性内切核酸酶免费提供)。

(16) 杂交冲洗液[3] [见注意事项 (3)]：

洗液 1：1×PE，1% SDS，300 mmol/L NaCl

洗液 2：1×PE，0.1% SDS，50 mmol/L NaCl

洗液 3：50%甲酰胺，1×PE，1% SDS，300 mmol/L NaCl

洗液 4：50%甲酰胺，1×PE，0.1%Tween-20，150 mmol/L NaCl

洗液 5：1×PE，0.1%Tween-20，500 mmol/L NaCl

(17) 胚胎粉末[2]：胚胎组织粉末应来源于与杂交样本相同的物种，从相似或更晚的发育阶段制备。然而，对于非常晚期妊娠的胎儿组织样本，采用妊娠中期的胚胎组织 [如 E14.5 的小鼠胚胎；见注意事项 (4)] 可包含组织分化产物但避免了夹杂过多的脂肪组织。

严格按照步骤 (2)① 中的方法制备胚胎组织粉末：

a. 用杜恩斯匀浆器或者与其类似的匀浆器在尽可能少的冷 PBS 液中将胚胎组织匀浆；

b. 加入 4 倍体积的冰冷丙酮，在冰上孵育 30 min；

c. 台式离心机离心得到沉淀，去除丙酮；

d. 用冰冷的丙酮重悬以洗涤离心的沉淀，然后再次离心；

e. 不断地研磨（如用光滑的玻璃棒）以风干离心沉淀，且制成精细粉末；

f. 置于密闭容器中－20℃保存。

在使用前，应对胚胎粉末进行加热灭活。每使用 5 ml 稀释的抗体溶液 [见 3.1.5，步骤 (1)]，可称取 1～3 mg 胚胎粉末加入 1 ml 的1×TBST 溶液中，然后 70℃加热 30 min。

(18) 半抗原标记探针的抗体：在 RNA 探针中掺入半抗原，用抗抗原的酶联抗体检测杂交的结果。常用的酶类有碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶等。碱性磷酸酶结合的抗体能够获得最高的敏感度，如碱性磷酸酶结合的抗地高辛抗体 (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN; cat. no. 1093274) 或碱性磷酸酶结合的抗荧光素抗体 (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN; cat. no. 1426338)。碱性磷酸酶催化无色底物四唑氮蓝 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐 (BCIP) 产生紫色/棕色不溶性沉淀物 [见步骤 (22)]。备选的碱性磷酸酶底物包括：HistoMark® Red (KPL, Gaithersburg, MD; cat. no. 55-69-00) 和 Vector Red™ (Vector Laboratories, Burlingame; cat. no. SK-5100)，这些碱性磷酸酶底物已在涉及序贯检测地高辛和荧光标记 RNA 探针的双色原位杂交[4]应用中描述过。辣根过氧化物酶结合抗体，如辣根过氧化物酶结合的抗地高辛

① 原文如此，但此处找不到对应的步骤 (2)。——译者注

抗体（Roche Applied Sciences，Indianapolis，cat. no. 1207733）或抗荧光素抗体（Roche Applied Sciences，Indianapolis，IN；cat. no. 1426346），可以与底物二氨基联苯胺（DAB）反应产生黑色/棕色染色；或与敏感性更高的底物 TrueBlue™（KPL，Gaithersburg，MD；cat. no. 71-00-64）反应产生蓝色染色[4]。它们可以运用于多重标记以便同时检测地高辛和荧光素标记的 RNA 探针[4]。

（19）用 75% N',N'-二甲基甲酰胺（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. D 4551）将四唑氮蓝（NBT，Sigma，St. Louis，MO；cat. no. N6639，N5514）配成 75 mg/ml，－20℃保存备用。

（20）用 100%的 N',N'-二甲基甲酰胺（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. D 4551）将 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐（BCIP，Sigma，St. Louis，MO；cat. no. B 6777，B 0274）配成 50 mg/ml，－20℃保存备用。

（21）NTMT 溶液：100 mmol/L NaCl、100 mmol/L Tris-HCl（pH 为 9.5）、50 mmol/L $MgCl_2$ 和 0.1%Tween-20。为了防止形成沉淀，临用前由储存液混合配制而成。

（22）为了检测整个胚胎组织中碱性磷酸酶的活性，将 45 μl NBT 溶液和 35 μl BCIP 溶液混合到 10 ml NTMT 溶液中，使用前新鲜配制，或者可以从多家公司购买预先混合好的碱性磷酸酶底物，用 TBST 冲洗以终止反应。

（23）用于检测切片上碱性磷酸酶的聚乙烯乙醇（PVA）溶液[5]：在 90℃的 100 mmol/L Tris-HCl（pH 为 9.0）中加入 70～100 kDa 的 10%（m/V）聚乙烯乙醇（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. P1763）；再加入 100 mmol/L NaCl 使之溶解，并待其冷却。

（24）为了利用 PVA 的增强作用来检测切片上碱性磷酸酶的活性，将 45 μl NBT 溶液、35 μl BCIP 溶液和 100 μl 1 mol/L $MgCl_2$ 加入到 20 ml 的冷 PVA 溶液中混合，使用前临时配制[5]。

（25）DAB 染色液：PBT 中加入 3，3′-二氨基联苯胺四氢氯化物（DAB，Sigma，St. Louis，MO；cat. no. D5637）配成 0.5 mg/ml，使用前加入 0.01%H_2O_2。由于 DAB 是一种强效的致癌物质，因此购买预先称量好的片剂或者预先混合好的溶液（如 DAB 底物药盒，Vector Laboratories，Burlingame；cat. no. SK4100；液态 DAB 底物药盒，Novocastra，UK；cat. no. NCL-L-DAB）可能更为合适。

（26）为了检测整个胚胎组织中辣根过氧化物酶的活性，将标本放入 DAB 染色液中孵育并监测颜色的改变，用 PBST 或 TBST 冲洗以终止反应。也可以根据产品操作说明书使用预先混合的染色液或 TrueBlue™染色液（KPL，Gaithersburg，MO；cat. no. 71-00-64）。

（27）使用与检测半抗原抗体种属相同的血清作为封闭液，如绵羊产生的抗地高辛抗体可使用绵羊/羔羊的血清（如 Sigma，St. Louis，MO；cat. no. S 2263）。欲热灭活血清，可用 1×TBST 将血清稀释至 10%，然后在 70℃加热 30 min。热灭活血清分装后－20℃保存。

（28）检测内源性糖苷酶（屏障测定）的染色混合液：100 mmol/L 磷酸钠，pH 5.5，1.3 mmol/L 氯化镁，3 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$、3 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$，1 mg/ml

5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷（X-gal；Sigma，St. Louis，MO；cat. no. B4252：由 N'，N'-二甲基甲酰胺配制的 20 mg/ml 储存液稀释而来）；0.1%脱氧胆酸钠（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. D 6750），0.2%聚乙二醇苯基醚 Ca-630（Igepal Ca-630；Sigma，St. Louis，MO；cat. no. I 8896）。

（29）用于屏障检测的 1%甲苯胺蓝溶液：将 1 g 甲苯胺蓝 O（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. T 3260）溶于 100 ml 水中。用水来溶解这一点很重要，不能使用盐溶液配制成的商品化缓冲甲苯胺蓝溶液或储存液。

3 方法

3.1 全组织包埋原位杂交［见注意事项（5）］

本节介绍由 Conlan 版本[3]修改而来的全组织包埋原位杂交操作规程[2,3]，可有效应用于胚胎/胎儿的表皮组织，直到保护性屏障在小鼠胚胎期 16～17 d 或小鸡胚胎 E17 形成为止。此时，新形成的角质层把 RNA 探针和抗体排除在表皮组织之外。就皮肤组织的分析而言，蛋白酶 K 的水平可明显低于标准实验规程中的水平，这是因为不必渗透到其下的深部组织，而脆弱的表面外胚层又必须加以保护免于受损。另外，在各个操作步骤中必须格外轻柔，以保护外胚层组织。

3.1.1 RNA 探针的产生

采用噬菌体 T7、T6 或 SP6 DNA 依赖性 RNA 聚合酶从噬菌体启动子下游克隆的 cDNA 转录产生 RNA 探针。大量商品化的克隆载体都包含了这些启动子序列，且其两侧带有多克隆位点。从表达序列标签（EST）库（如 I. M. A. G. E. clones，http：//image. llnl. gov）中获得的 cDNA 通常属于这种数据形式。如果转录前用限制性内切核酸酶消化质粒使所插入 cDNA 的下游线性化，则转录效率将更高。

另一个方法是，将 T7、T3 或 SP6 启动子序列 5′端掺入到同源区域来修饰引物，利用这些引物通过聚合酶链反应也可以从适当的来源获得用于转录的 DNA 模板。

转录前应对 DNA 进行纯化（如 Qiagen MinElute Cleanup Kit，Qiagen，Valencia），并收集到水中，浓度约为 1 μg/μl。

SP6-RNA 探针的 RNA 可以利用附有详细说明书的商品化试剂盒进行合成（例如，Promega，Madison，MI；http：//www. promega. com；Roche Applied Sciences，Indianapolis，IN；http：//www. roche-applied-science. com）。标记核苷酸的半抗原通常是地高辛、荧光素或者生物素-标记 UTP（Roche Applied Sciences，Indianapolis，IN）。另外，也可以应用以下的操作规程。

体外转录法制备核酸探针，可按如下方法混合：

（1）水（无需焦碳酸二乙酯处理）20 μl；

（2）4 μl 的 5×转录缓冲液；

（3）2 μl 的 10×核苷酸标记混合物；

（4）2 μl 的 0.1 mol/L DTT（可以从大多数商品化聚合酶制剂中获得）；

（5）1 μl 的核糖核酸酶抑制剂（10～50 U/μl）；

（6）1 μl 的 DNA 依赖性 RNA 聚合酶（T7、T3 或 SP6 RNA 聚合酶）；

（7）1 μl 的线性模板或 0.1～0.3 μg 的扩增 DNA。

37℃下孵育 2～4 h（使用 SP6 RNA 聚合酶时温度为 40℃）。加入 2 μl 0.2 mol/L 的 EDTA（pH 为 8.0）终止反应。为了估计产率，可以除去未掺入的核苷酸；或者不需进一步“清洗”，而将核酸探针直接加入到杂交混合物中。为除去未掺入的核苷酸，可加入 2.5 μl 4 mol/L 的 LiCl 和 75 μl 乙醇来沉淀 RNA。混合后在－20℃保存 5 min 至过夜，小型离心机最大速度离心 20 min 以收集 RNA。或者采用商品化的富集柱，例如，根据制造商的操作说明书，使用 Qiagen 公司的 RNA 纯化试剂盒（Qiagen RNeasy Cleanup Kit，Qiagen，Valencia）进行收集。

取反应前后各一等份的反应混合物（如 1 μl）在 1%琼脂糖中进行凝胶电泳，然后在紫外灯下对已合成的 RNA 进行显像，从而评估其产率。如果反应后所见 RNA 条带的密度是质粒模板的 10 倍，则说明大约合成了 10 μg 的 RNA[2]。不需要用 DNA 酶来降解模板。

3.1.2 胚胎组织的收集［见注意事项（5）］

（1）新鲜切取的胚胎组织在冰冷的 4%多聚甲醛溶液（用 PBS 配制）中固定 4 h 至过夜，并置于冰上且轻柔摇动。

（2）胚胎/胎儿组织经一系列甲醇溶液处理以脱水：25%甲醇/75%PBST 5 min；50%甲醇/50%PBST 5 min；75%甲醇 5 min［见注意事项（6）］。

（3）胚胎组织在 100%甲醇溶液中漂洗三次，每次 10 min，可以在－20℃下保存数月。

3.1.3 胚胎/胎儿组织的预处理

（1）胚胎/胎儿组织在甲醇：H_2O_2（5：1）中孵育 1～2 h（除非另有说明，所有孵育均在室温下进行），轻柔摇动以灭活内源性过氧化物酶，以及漂白皮肤中的色素。

（2）胚胎组织再通过一系列甲醇溶液的处理进行再水化：75%甲醇溶液 5 min；50%甲醇/50%PBST 5 min；25%甲醇/75%PBST 5 min；然后在 PBST 中清洗三次，每次 5 min。

（3）胚胎组织在含有不同浓度蛋白酶 K 的 PBST 溶液中准确孵育 10 min［见注意事项（7）］。每一批次蛋白酶 K 的浓度一般靠经验来确定。例如，对 CD1 系小鼠不同时期的胚胎组织所用蛋白酶 K 的不同浓度为：E9.5（2 μg/μl）；E11（3 μg/μl）；E13（6 μg/μl）；E14（12 μg/μl）；E15（24 μg/μl）；E16（32 μg/μl）。

（4）用 1×PBST 新鲜配制甘氨酸溶液（浓度达到 2 mg/ml），将胚胎组织在此溶液中清洗两次，每次 5 min，以灭活蛋白酶 K。

（5）用 PBS 配制的 4%多聚甲醛和 0.2%戊二醛固定液再次固定胚胎组织 20 min，然后用 PBST 清洗三次，每次 5 min。

（6）用新鲜配制的含有 0.1%四氢硼酸钠的 PBST 溶液处理 20 min（这一步可以阻断自由醛基），然后用 PBST 溶液冲洗三次，每次 5 min（注意在这一操作过程中试管

盖不要拧紧，以利于释放产生的气体)。

(7) 用含有甲酰胺的杂交缓冲液清洗两次。胚胎/胎儿组织在甲酰胺中平衡后可以保存于−20℃，直到准备杂交。

3.1.4 杂交 [关于可选择性杂交后的核糖核酸酶处理见注意事项 (3)][4]

(1) 在 63℃预杂交至少 1 h [见注意事项 (8)]。

(2) 更换新鲜的杂交缓冲液，添加探针，浓度为 1～2 μg/ml，轻柔滚动下 63℃杂交过夜。

(3) 用洗液 1 漂洗数次，然后置于洗液 1 中轻柔滚动清洗两次，63℃ 30 min。

(4) 用洗液 2 漂洗数次，然后置于洗液 2 中轻柔滚动清洗两次，50℃ 30 min。

(5) 用洗液 3 漂洗，然后置于洗液 3 中轻柔滚动清洗，50℃ 30 min。

(6) 用洗液 4 漂洗，然后置于洗液 4 中轻柔滚动清洗，50℃ 30 min。

(7) 用洗液 5 漂洗数次 (升高温度前除去洗液 4 中的甲酰胺)，然后在洗液 5 中 70℃孵育 20 min。如果使用标记的磷酸酶进行核酸探针检测，则此步可以灭活内源性磷酸酶。

3.1.5 已杂交探针的抗体检测

(1) 针对半抗原标记探针的抗体用胚胎组织粉末预吸收，以去除其抗胚胎组织活性。抗体用冷 TBST 稀释成 1/2000～1/5000 [见注意事项 (9)]。2 mmol/L 左旋咪唑、1%血清，以及已灭活的胚胎组织粉末一起在 4℃孵育 30 min，并轻柔滚动，然后在 4℃用台式离心机离心 10 min，去除沉淀的胚胎组织粉末。

(2) 用含 10%热灭活血清及 2 mmol/L 左旋咪唑的 TBST 阻断胚胎/胎儿组织，轻柔摇动 1 h。

(3) 胚胎/胎儿组织与预吸收处理过的第二抗体共孵育，4℃轻柔摇动过夜。

(4) 用含有 2 mmol/L 左旋咪唑的 TBST 室温下漂洗三次。

(5) 用含有 2 mmol/L 左旋咪唑的 TBST 漂洗 6 次，1 h。为方便起见，常将最后一次清洗浸泡过夜。

3.1.6 显色

为了检测碱性磷酸酶结合的第二抗体，用新鲜制备含有 2 mmol/L 左旋咪唑的 NTMT 漂洗三次，轻柔摇动，每次 10 min。在含 NBT/BCIP 的 NTMT 中孵育 [见材料的步骤 (22)]，在玻璃皿中避光进行显色反应。监测反应进行情况，并通过 TBST 冲洗来终止反应，然后转移至 4%多聚甲醛中。可无限期保存于 4℃。

为了检测过氧化物酶结合的第二抗体，可用 DAB 或者 TrueBlue™显色染色混合物 [见材料的步骤 (26)] 孵育，直到显色。用 PBST 或 TBST 冲洗后转移到 4%多聚甲醛中。可无限期保存于 4℃。

3.1.7 胚胎/胎儿组织成像

用 1%琼脂糖水溶液的凝胶将胚胎/胎儿组织固定在培养皿的底部。这可将胚胎组

织置于一薄层融化的琼脂糖凝胶上待其冷却；或者用琼脂糖溶液铺板，然后用热金属丝/玻璃棒（wire/glass rod）融化局部的琼脂糖凝胶表面，再将胚胎组织贴上。如此固定是为了防止照相时组织的摆动，以及允许从各个不同角度进行照相。然后用适量的TBS或PBS覆盖，照相可透过溶液进行。为了避免表面反光及皮肤脱水，有必要完全浸没胚胎/胎儿组织。照相在配有光学纤维照明装置的立体显微镜下进行。

3.1.8 杂交后皮肤切片

全组织包埋原位杂交技术与切片原位杂交相比，是一种更有效、更为敏感的检测RNA的方法。这可能是由于杂交前的组织解剖和处理最少，从而减少了RNA的降解；杂交后的切片常用于定位细胞中的RNA。

虽然可以采用标准的技术制备杂交后胚胎/胎儿组织的石蜡切片，但之所以会受到限制是因为某些颜色的沉淀物可部分地溶解于乙醇或二甲苯，从而导致信号减弱。

在全组织包埋原位杂交后进行冰冻切片，提供了一种在细胞水平定位RNA的最快捷和最简便的方法，然而对组织的完整性有一定程度的破坏。为了提高敏感度，可以在杂交冲洗步骤之后、抗体检测之前制备冰冻切片（比如，完成3.1.4后，进行胚胎组织冰冻切片，然后再进行3.1.5所示的封闭、检测抗体）。对全胚胎组织冰冻切片进行抗体检测可以获得更强的信号，这可能是由于试剂更容易进入组织所致。

对切片而并非整个胚胎组织的碱性磷酸酶进行检测，可使高分子质量聚乙烯醇（PVA）参与到BCIP/NBT显色反应中[5]，能增强和提高信号强度，有助于检测微量的mRNA[5] [见注意事项（9）]。

3.1.9 全组织包埋RNA和蛋白质信号的比较

Nishioka等[6]采用微波穿透胚胎/胎儿组织表皮层的全组织包埋抗体染色方法是一种对全组织包埋中蛋白质进行免疫组织化学定位的简单、有效的方法。目前已经完成了对胚龄配对胎儿的胚胎组织RNA和蛋白质模式的比较研究。另一方法是，对妊娠年龄较大的单个胎儿在多聚甲醛/PBS溶液中进行短暂固定（30 min），提供硬度后，可以纵向对等切开。分开的两半胚胎组织可以分别用于原位杂交和免疫组织化学染色，然而已有文献介绍了同时或连续进行原位杂交和免疫组化的实验操作流程[4]。

3.2 屏障功能检测 [见注意事项（10）]

全组织包埋染料渗入或排除的屏障功能检测能够发现发育过程中屏障形成的缺陷或加速，或成体皮肤的屏障功能缺陷。第一步是利用甲醇短暂处理以修饰皮肤，这一操作是除去皮肤表面的脂质，此时组织学检查所用染料的渗透就依赖于屏障的完整性。第二步是检测内源性糖苷酶，它们大部分来源于溶酶体，在pH 3.0～6.0时有活性。人造底物5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷（X-gal）的渗透则依赖于功能不全的屏障。这一步需要设置对照，例如，将出生后的皮肤组织作为屏障的阳性对照，而胚胎16 d以前的胎鼠皮肤或创伤的成体皮肤作为阴性对照。

小鼠皮肤保护性屏障的形成具有种系依赖性，而且与胎鼠重量的关系比估算妊娠期更为密切。CD1系小鼠屏障形成于胚胎16 d，相应的胎鼠重量为0.6～0.9 g。然而，

C57B16 系小鼠和 CBA 系小鼠的杂交后代常用于产生转基因小鼠，其屏障形成于 E17（胚胎 17 d），超过了类似的胎鼠重量范围。SD 大鼠在胚胎 E18（18 d）形成皮肤屏障[1]，而小鸡的皮肤屏障形成于胚胎 17 d（Byrne 和 Hardman 的未发表资料）。

3.2.1 染料渗入的屏障功能测定，方法 1

这种屏障功能测定法修饰了皮肤组织，以保证组织学检查所用染料能屏障依赖性渗入。这一修饰的本质目前尚不清楚，很可能涉及除去皮肤表面的极性脂质。这种测定方法可用于已用各种标准固定剂（如甲醛、戊二醛及 Bouins 固定剂等）固定过的组织。

（1）在梯度浓度的甲醇中先升后降地处理组织，每一浓度 30 s 至 1 min：① 25%甲醇水溶液；② 50%甲醇水溶液；③ 75%甲醇水溶液；④ 100%甲醇溶液；⑤ 75%甲醇水溶液；⑥ 50%甲醇水溶液；⑦ 25%甲醇水溶液；⑧ 组织置于 PBS 溶液或水中进行平衡。

（2）如将胚胎/胎儿组织置于染料混合液［1%甲苯胺蓝水溶液，见**材料**的步骤（29）］中染色，则在 pH 7.4 的 PBS 中脱色至染色模式出现。高 pH 的 PBS 溶液能够加快脱色速度，为成功显色所必需。

（3）如果使用的标本是小片皮肤，则将其置于含有凡士林凝胶的培养皿中使其真皮面封闭（将组织稍微埋入凝胶中，让表皮面显露在外）。在平皿表面涂抹凡士林凝胶或者将凡士林凝胶加入平皿中，然后用微波炉加热融化后静置以形成平整的表面，就像培养细菌的琼脂平皿。局部加入染料混合液（如使用新鲜制备的 1%甲苯胺蓝水溶液），然后在 pH 7.4 的 PBS 中脱色至染色模式出现。

（4）按 3.1.7 中所述的方法尽快进行照相，以防染料扩散或染色模式模糊。

3.2.2 染料渗入的屏障功能测定，方法 2

这种屏障功能测定法利用了鼠类皮肤中存在的内源性糖苷酶在低 pH（pH3.0～6.0，最佳 pH 为 5.5 左右）下具有活性的特点。这一糖苷酶活性可裂解底物 X-gal 产生一种蓝色的不溶沉淀，提示 X-gal 可以穿透皮肤屏障。因此，只有当皮肤屏障功能尚未形成或功能障碍时，这种糖苷酶的活性才能在局部起作用。不需要浓度先升后降的一系列甲醇溶液处理，仅仅简单地将胚胎组织置于染料混合液中，或按上面所述的方法封闭样本的真皮面并在局部加入染料混合液，进行孵育（37℃孵育时反应发生更快，然而室温下孵育的组织形态更好）。由于内源性糖苷酶对固定剂敏感，因此这种方法只能用于未固定或部分固定的新鲜组织［见注意事项（11）］。组织可以在染色后进行固定，其着色可保持稳定。再按 3.1.7 所述步骤进行照相。

4 注意事项

（1）将水溶液用 0.1%焦碳酸二乙酯（DEPC，Sigma，St. Louis，MO；cat. no. D 5758）预处理 2 h 至过夜，灭活核糖核酸酶，然后在标准条件下高压灭菌 40 min 以分解焦碳酸二乙酯。

（2）当采用碱性磷酸酶进行反应时，应该用三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液代替全组

织包埋原位杂交后期步骤中的磷酸盐缓冲盐溶液，这是为了去除抑制性的磷酸盐。三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液不必用 DEPC 处理，但是需由经过 DEPC 处理过的试剂配制。在洗液中添加左旋咪唑以抑制内源性磷酸酶的活性。

（3）许多作者在杂交后的第二和第三次清洗步骤之间进行核糖核酸酶的处理，去除未掺入的 RNA[2,3]，这一步可以改善背景，但用于皮肤组织时常可省略。为了进行核糖核酸酶处理，可将胚胎/胎儿组织在核糖核酸酶缓冲溶液（10 mmol/L PIPES，pH7.2、0.5 mol/L NaCl、0.1%Tween-20）中漂洗数次，然后用 50 μg/ml 热处理过的 RNA 酶 A［例如，将来源于牛胰腺的核糖核酸酶 A（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. R4875）溶于 TE 溶液中，浓度为 10 mg/ml，煮沸 10 min 进行热处理，然后冷却、分装，－20℃保存备用］37℃孵育 30 min[3]。

（4）小鼠和大鼠的胚胎分期定为发现阴道栓的那天为 d0.5 或 E0.5。鸡胚胎分期将开始孵育的时间定为 d0（E0）。

（5）胚胎的表皮组织非常脆弱，必须尽量减少人为操作，要轻柔地摇动组织。如较小的胚胎需要转移，可将巴斯德吸管或塑料移液管倒转，用其较宽的末端吸取细小的胚胎组织进行转移，以避免损伤表面的外胚层。

（6）对于较大的妊娠后期胚胎组织需要更长的平衡时间，而对较小的胚胎组织可能并非必需。

（7）对其他的实验操作流程，可使用固定浓度的蛋白酶 K，但作用的时间不同。蛋白酶 K 的浓度对于此方法的成功与否非常重要，而且每一批次蛋白酶 K 的使用浓度要靠经验确定。

（8）杂交和杂交后的冲洗步骤可以在标准的旋转式杂交炉中进行，它配有 50 ml 一次性无菌塑料管及其附件旋转器。对于少量组织的杂交来说，可以先将胚胎/胎儿组织置于更小的吸管中，再放入 50 ml 试管中。杂交后的冲洗步骤可以直接在 50 ml 试管中进行。

（9）对已杂交胚胎组织的切片进行抗体检测时，冲洗时间可以至少减少一半。对整个胚胎/胎儿组织进行碱性磷酸酶显色反应时，使用高分子质量 PVA 溶液会出现不可接受的背景，因此这种增强信号的方法只能运用于组织切片。

（10）全组织包埋的染料渗入或比色法的屏障功能测定，可以揭示皮肤屏障的主要缺陷或变化。实际上，皮肤屏障不断地发育和完善可一直持续到胚胎发育的很晚期，甚至可能到出生后早期。因此，屏障形成过程中，一些晚期或微小的缺陷也许不能通过上述检测来发现。一种经皮水丧失的屏障功能测量方法可检测这些变化，它使用特定仪器（例如：Tewometer，CK Electronics GmbH，Berlin；Evaporimeter，Servo-Med，Cairo）定量测定新生或幼年无毛动物皮肤表面的水蒸气压力梯度。

（11）在检测内源性糖苷酶（和转基因编码的 β-半乳糖苷酶）活性时，交联固定剂如戊二醛和甲醛等，有可能会降低酶的活性，因为酶也会发生交联。省略固定这一步或者显色完成后再进行固定，会破坏组织的完整性。然而，表皮组织非常结实，即使对不固定或者固定不充分的表皮组织进行切片，也仍能清楚地区分表皮角质形成细胞和表皮组织的层次。

（林　恒 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Hardman, M. J. , Sisi, P. , Banbury, D. N. , and Byrne, C. (1998) Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* **125**, 1541—1552.

[2] Xu, Q. , and Wilkinson, D. G. (1997) In situ hybridization of mRNA with hapten labeled probes, in *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, 2nd ed. (Wilkinson, D. G. , ed.), IRL Press, Oxford, pp. 87—106.

[3] Conlon, R. A. and Rossant, J. (1992) Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development* **116**, 357—368.

[4] Jowett, T. (1997) Two colour in situ hybridisation, in *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, 2nd ed. (Wilkinson, D. G. , ed.), IRL Press, Oxford, pp. 107—126.

[5] De Block, M. and Debrouwer, D. (1993) RNA-RNA in situ hybridization using digoxigeninlabeled probes: the use of high-molecular-weight polyvinyl alcohol in the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction. *Anal. Biochem.* **215**, 86—89.

[6] Nishioka, E. , Tanaka, T. , Yoshida, H. , Matsumura, K. , Nishikawa, S. , Naito, A. , et al. (2002) Mucosal addressin cell adhesion molecule 1 plays an unexpected role in the development of mouse guard hair. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 632—638.

第 16 章　斑马鱼早期表皮发育的分析

Ashley E. Webb，David kimelman

摘　要：斑马鱼（*Danio rerio*）是硬骨鱼的一种，大约在 4 亿 2 千万年前硬骨鱼与哺乳动物分离。尽管鱼类和哺乳动物的祖先很早就分开，但它们的表皮有很多重要的相似之处。另外，最近的研究工作表明，斑马鱼表皮发育所需要的基因对于较高等的脊椎动物的表皮发育也是必需的，说明对斑马鱼的研究有助于理解小鼠和人类的发育。斑马鱼是一种非常有用的遗传系统，大规模的遗传筛选获得了许多表皮发育缺陷的突变体。而且，斑马鱼的胚胎透明，可在体外发育，能被大量收集。本章的目的是给研究者提供检测斑马鱼发育中基因表达、细胞增殖和细胞死亡的基本方法。尽管迄今在斑马鱼中仅鉴定出少量的特异性表皮标记基因，我们还是列出了对于表皮发育研究有用的基因。

关键词：表皮；斑马鱼（zebrafish）；原位杂交；溴脱氧尿苷（BrdU），末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记（terminal deoxynucleotidyltrans-ferase dUTP nick end labeling，TUNEL）；免疫细胞化学

1　导言

1.1　成年斑马鱼的表皮

斑马鱼皮肤的结构和功能与高等脊椎动物相似。尽管对鱼来说脱水并不是一个问题，但其表皮仍然充当内部器官与环境之间的保护层。与哺乳动物相同，鱼类的皮肤也由真皮层和表皮层组成。在包括斑马鱼在内的硬骨鱼的鱼鳍中，这两层紧邻并列，仅由基底膜分离。相反，在斑马鱼的躯干上，皮肤硬化组织（鱼鳞）嵌入真皮层中，表皮层包裹在鱼鳞上，仅偶尔与真皮层接触（图 16.1）。不同部位的表皮层的厚度在 2～12 个细胞之间，可能主要由含丝状体的单一细胞类型组成[1,2]。这种结构是哺乳动物表皮层的一种简化，因为鱼类的表皮层不是真正分层的上皮，最外面的表皮层不像哺乳动物那样是角质层，而是由有核细胞组成[3]。

哺乳动物表皮的更新是通过表皮最底层的细胞增殖和最外层细胞的脱落来实现的。在金鱼（*Carassius auratus*）中的研究已表明，成年硬骨鱼表皮中的细胞增殖不仅仅局限于最底层的细胞，而是发生在整个表皮层[3]。尽管存在组织结构上的差别，但从鱼类到哺乳动物，表皮维持所需的基因可能是保守的。例如，P63 蛋白在哺乳动物的表皮增殖与维持中起作用，它也存在于成年的斑马鱼表皮中[4,5]。

像哺乳动物的表皮一样，斑马鱼的表皮含大量的角蛋白[6,7]。最近在斑马鱼中利用

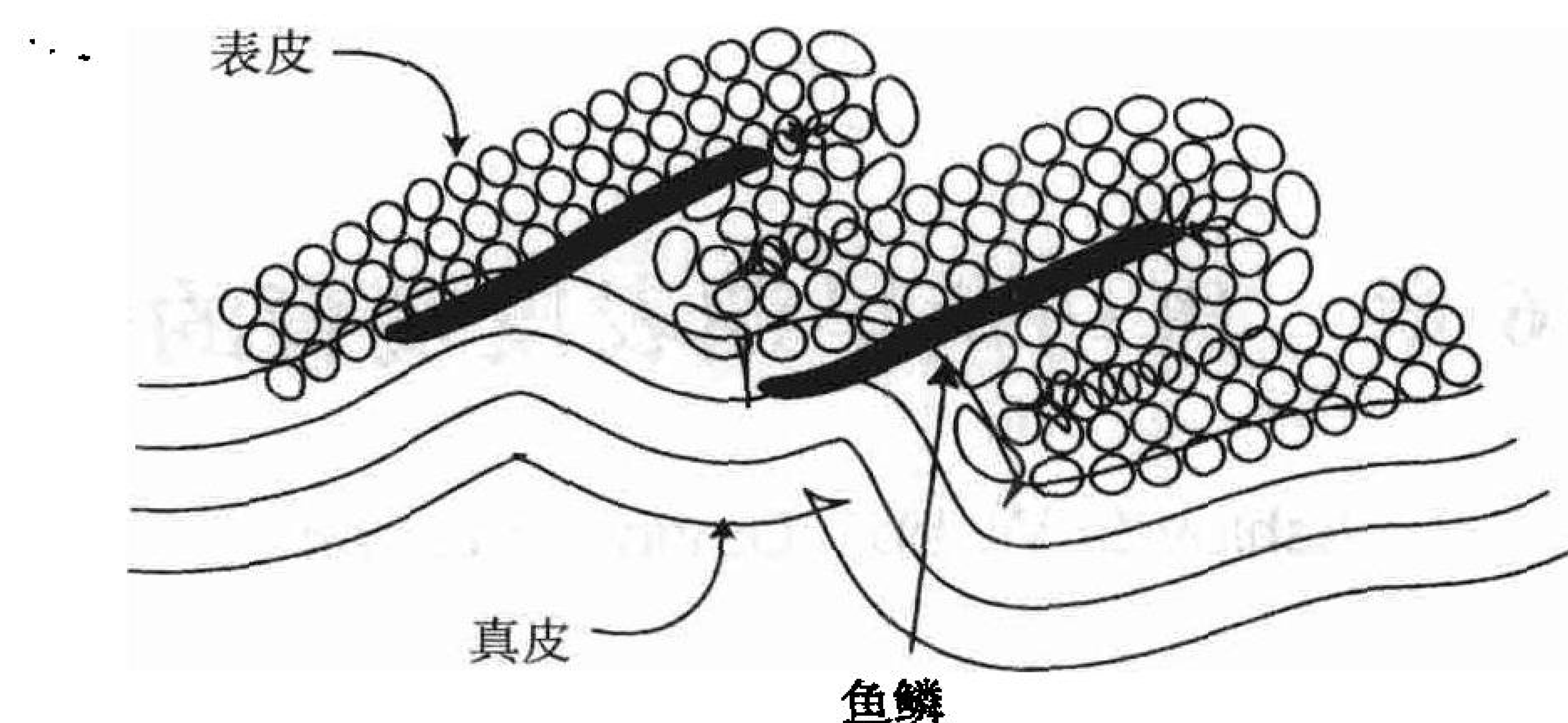


图 16.1 斑马鱼皮肤的结构

表皮由数层细胞构成，鱼鳞在表皮之下，与真皮相连。

一系列抗体的研究表明，其表皮可能含 2 种 I 类角蛋白和 4 种 II 类角蛋白[6]。现在还不知道是否像在哺乳动物皮肤中一样，不同的角蛋白在表皮的不同区域表达；或者所有的表皮细胞都含有同样的角蛋白成分。

1.2 斑马鱼的表皮发育

根据斑马鱼的囊胚发育图，表皮细胞起源于胚胎的腹侧，靠近动物极[8]。这些细胞表达表皮标记基因 *gata2* 和 Δ*Np63*，它们都编码转录因子[4,9]。Δ*Np63* 在哺乳动物表皮的发育和维持过程中的作用已得到广泛研究[10,11]。有趣的是，破坏小鼠的 *p63* 位点会导致表皮的缺失[12,13]，人 *p63* 基因的突变导致多种皮肤缺陷[14~16]。也有研究证明 Δ*Np63* 为斑马鱼表皮发育所必需，提示该基因功能的获得先于 4 亿 2 千万年前鱼类和哺乳动物的分离[4,5]。

斑马鱼角蛋白 8（zf-K8）是自原肠胚后期到成鱼阶段斑马鱼表皮的一个有用标记[17]。在原肠胚形成之前和期间，zf-K8 在胚胎的包被层（enveloping layer）表达，包被层是覆盖发育中胚胎的一种胚外组织。在爪蟾和小鼠中已研究过 K8 中间丝，在这些系统中的功能缺失研究表明 K8 对于原肠胚形成中的细胞运动是必需的[18~20]。值得研究的是，是否此作用在斑马鱼中是保守的，以及是否 zf-K8 在此系统中尚有后期作用。

利用斑马鱼研究表皮发育的优点在于其在遗传学上的功效。对斑马鱼已进行了几次大规模遗传筛选，获得了很多表皮发育缺陷的突变体品系[21,22]。这些突变体品系可能包括了已知的表皮发育必需基因的突变，也可能还有一些参与表皮发育的新基因的突变。对这些突变体的研究可能有助于广泛了解包括硬骨鱼在内的鱼类表皮发育，也将进一步增进我们对哺乳动物表皮发育的认识。

本章提供了可用于斑马鱼表皮发育的若干实验方法，对这些方法稍加修改可用于成鱼的研究。这些方法可用来检测斑马鱼的基因表达、细胞增殖和凋亡。需要提醒的是，所列试剂在我们的实验室是好用的，但其他来源的试剂一般也是可以的。其他的实验方法可参考 *The Zebrafish Book*[23]。

2 材料

2.1 有用的表皮标记基因

(1) Δ*Np63* 在从原肠胚形成到受精后 5 d，以及在成鱼的表皮中表达[4,5]。

(2) *Gata2* 在原肠胚形成期间的表皮细胞中表达[9]。

(3) Zf-K8 在原肠胚期的胚胎包被层和成鱼的表皮中表达。

2.2 探针合成

(1) 线性化的脱氧核糖核酸（DNA）模板。

(2) 酚：氯仿：异戊醇（50：48：2）。

(3) 100%和 70%乙醇。

(4) 焦碳酸二乙酯（diethypyrocarbonate，DEPC）处理过的水。

(5) 转录反应：①转录缓冲液 [随每一核糖核酸（RNA）聚合酶提供]；②10×地高辛（DIG）RNA 标记混合物（Roche；cat. no. 1277073）；③10×荧光素 RNA 标记混合物（Roche；cat. no. 1685619），用于双色原位杂交；④核糖核酸酶（RNA 酶）抑制剂（Ambion；cat. no. 2682）；⑤ T7、T3 或 SP6 聚合酶（Roche；cat. no. 0810274，no. 1031163，no. 0881767）。

(6) DNA 酶（DNase）（Roche；cat. no. 0776785）。

(7) G-50 葡聚糖凝胶快速离心柱（Sephadex Quick Spin Column）（Roche；cat. no. 1274015）。

(8) 5 mol/L 乙酸铵（高压灭菌清除 RNA 酶）。

(9) 异丙醇（新瓶开启后注意保持无 RNA 酶污染）。

(10) 杂交缓冲液 [见 2.3 的步骤（4）]。

2.3 原位杂交

(1) 4%多聚甲醛，溶于 pH7.0～7.5 的磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）（每周新鲜配制，保存于 4℃）。

(2) PBSTw：含 0.1% Tween-20 的 PBS。

(3) 蛋白酶 K：10 mg/ml，溶于 PBSTw，保存在−20℃。

(4) 杂交缓冲液（保存于−20℃）：50%甲酰胺，5×SSC，50 μg/ml 肝素，500 μg/ml tRNA，0.1% Tween-20，无菌水，用 1 mol/L 枸橼酸调 pH 至 6.0。

(5) 20×标准枸橼酸盐水（SSC）：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 枸橼酸钠，根据起始 pH 用 HCl 或 NaOH 调至 7.0。

(6) 封闭液：PBSTw，2%（*V/V*）热灭活山羊血清 [见注意事项（1）]（Gibco；cat. no. 16210），2 mg/ml 牛血清白蛋白（Sigma；cat. no. A-2153）。

(7) 碱性磷酸酶结合的抗地高辛配基的 Fab 片段（Roche；cat. no. 1093274）和用于双色原位杂交的抗荧光素的 Fab 片段（Roche；cat. no. 1207741）。

(8) 染色缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl（pH 9.5），50 mmol/L $MgCl_2$，

100 mmol/L NaCl，0.1% Tween-20，无菌水。

(9) 硝基蓝四唑（NBT）(Roche；cat. no. 1087479)。

(10) 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐（BCIP）(Roche；cat. no. 1585002)。

(11) 原位杂交玻璃瓶（Fisher；cat. no. FS60940D-1)。

(12) 0.1 mol/L 甘氨酸，用 HCl 调至 pH 2.2（用于双色原位杂交)。

(13) 坚固红片剂（用于双色原位杂交）(Sigma；cat. no. F-4648)。

2.4 免疫细胞化学

(1) PBSTw（含 0.1% Tween-20 的 PBS)。

(2) 蛋白酶 K：10 mg/ml，溶于 PBSTw，保存在－20℃。

(3) 封闭液 [见 2.3 的步骤 (6)]。

(4) 二氨基联苯胺盐酸盐（Polysciences，Inc.；cat. no. 04008)。

(5) 过氧化氢。

2.5 溴脱氧尿苷（BrdU）掺入法

(1) BrdU（Sigma；cat. no. B-5002)。

(2) Ringer 液：116 mmol/L NaCl，2.9 mmol/L KCl，1.8 mmol/L $CaCl_2$，5 mmol/L HEPES，pH7.2。

(3) 二甲基亚砜（DMSO)。

(4) 2 mol/L HCl。

(5) 异硫氰酸荧光素结合的抗 BrdU 抗体（BD Biosciences；cat. no. 347583)。

2.6 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记（TUNEL）

(1) PBSTw（含 0.1% Tween-20 的 PBS)。

(2) 含 0.1%Triton X-100 和 0.1%枸橼酸钠的 PBS。

(3) 末端脱氧核苷酸转移酶（Invitrogen；cat. no. 10533065)。

(4) 脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）缓冲液（Invitrogen；cat. no. Y95102)。

(5) 地高辛配基标记的 dUTP（Boehringer-Mannheim；cat. no. 1209256)。

(6) 封闭液 [见 2.3 的步骤 (6)]。

(7) 碱性磷酸酶结合的抗地高辛的 Fab 片段（Roche；cat. no. 1093274)。

(8) NBT（Roche；cat. no. 1087479)。

(9) BCIP（Roche；cat. no. 1585002)。

(10) 染色缓冲液 [见 2.3 的步骤 (8)]

3 方法

3.1 原位杂交

3.1.1 探针合成

(1) 用合适的限制性内切核酸酶线性化 10 μg DNA [见注意事项 (2)]，酚：氯

仿∶异戊醇抽提两次。

（2）乙醇沉淀，用 10 μl DEPC 水重悬 DNA。

（3）转录反应：2 μl 10×转录缓冲液，2 μl 10× DIG（或荧光素）标记 RNA 混合物，1～2 μg 线性化 DNA 模板，1 μl RNA 酶抑制剂，1 μl T7、T3 或 SP6 聚合酶，DEPC 水补充至 20 μl，37℃温浴 2 h。

（4）加 1 μl 无 RNA 酶的 DNA 酶，37℃温浴 30 min。

（5）加 80 μl DEPC 水。

（6）按产品手册要求准备一个 G-50 葡聚糖凝胶快速离心柱，加入 100 μl RNA 混合物，以临床用离心机的最大转速的 3/4 离心 5 min。

（7）加入 10 μl 5 mol/L 乙酸铵和 110 μl 异丙醇。

（8）以最大转速（离心力 14 000 *g*，相当于标准台式微量离心机的 14 000 r/min），4℃离心 30 min。

（9）用 70%乙醇洗涤沉淀，以最大转速离心 10 min。

（10）除去上清，室温空气中干燥沉淀数分钟。

（11）用 40 μl DEPC 水重悬沉淀，在 1%琼脂糖凝胶上加样 2 μl 电泳以检测 RNA 的质量［见注意事项（3）］。上样前，RNA 探针应在 70℃加热 2 min 以除去其二级结构。探针在胶上应该只有一个条带。

（12）加 160 μl 杂交缓冲液，保存于－20℃。

3.1.2 原位杂交（图 16.2B）

所有步骤在容积 250～500 μl 的微型离心管中进行。漂洗步骤不需要搅拌，除特殊要求外都是在室温操作。

（1）用 4%多聚甲醛室温 2 h 或 4℃过夜固定胚胎；用镊子手工剥脱胚胎的绒毛膜；超过受精后 18 h 的胚胎应在固定前脱膜，以免尾部卷曲。胚胎可立即使用，或者用 100%甲醇脱水后储存于－20℃，可达数月之久。

（2）PBSTw 漂洗胚胎 5 次，每次 5 min。

（3）超过受精后 10 h（10 hpf）的胚胎，应用 10 μg/ml 的蛋白酶 K（溶于 PBSTw）进行通透处理如下：10 hpf，1 min；12 hpf，2 min；16 hpf，4 min；24 hpf，5 min；36 hpf，8 min；48 hpf，11 min。

（4）4%多聚甲醛重新固定胚胎，室温 20 min；PBSTw 漂洗胚胎 5 次，每次 5 min。

（5）用杂交液预杂交胚胎，65℃水浴 1 h。

（6）向杂交液中加入标记的探针。由于探针的质量不同，应首先测试不同探针浓度（如 1∶50 到 1∶300 等）的效果。

（7）在 65℃水浴中杂交 12～36 h（时间取决于探针的质量）。

（8）取出用过的探针并保存，探针可重复利用若干次。按下列步骤漂洗胚胎。

65℃水浴，每次漂洗 15 min 步骤如下。

a. 75%杂交液∶25% 2× SSC；

b. 50%杂交液∶50% 2× SSC；

c. 25%杂交液：75% 2× SSC；

d. 2× SSC；

65℃水浴，在 0.2× SSC 中漂洗两次，每次 30 min。

室温漂洗，每次 5 min，步骤如下：

e. 75% 0.2× SSC：25% PBSTw；

f. 50% 0.2× SSC：50% PBSTw；

g. 25% 0.2× SSC：75% PBSTw；

h. PBSTw。

(9) 抗体检测地高辛标记的探针：在封闭液中孵育胚胎，室温 1 h。

(10) 除去封闭液，加入碱性磷酸酶结合的抗地高辛配基的 Fab 片段（anti-dig-AP antibody)，用封闭液按 1：5000 进行稀释，室温孵育 2 h，或 4℃过夜。

(11) PBSTw 漂洗胚胎 5 次，每次 15 min。

(12) 显色反应：用染色缓冲液漂洗胚胎两次，每次 10 min。

(13) 用 NBT/BCIP 溶液置换染色缓冲液［见注意事项（4)]：45 μl NBT，45 μl BCIP，10 ml 染色缓冲液。

(14) 对于单染色的原位杂交，用 PBSTw 漂洗以停止反应，4%多聚甲醛重新固定 20 min。用 PBSTw 洗去胚胎的固定剂（4 次，5 min/次）以后，胚胎可以保存在甲醇中，或立即转移到 70%甘油后包埋供拍照。在浓度递增的甘油中转移步骤如下：75% PBS：25%甘油，50%PBS：50%甘油，30%PBS：70%甘油，每次漂洗 10 min。

(15) 对于双染色原位杂交，用 PBSTw 漂洗胚胎后，再用 pH 2.2 的 0.1 mol/L 甘氨酸孵育两次，每次 10 min。

(16) 用 PBSTw 漂洗三次，每次 5 min。

(17) 封闭液中孵育胚胎，1 h。

(18) 加入结合碱性磷酸酶的抗荧光素抗体（1：10 000 稀释于封闭液），室温 2 h。

(19) 用 PBSTw 漂洗 5 次，每次 15 min。

(20) 坚固红［见注意事项（5)]：①pH 8.2 的 0.1 mol/L Tris 中洗两次，每次

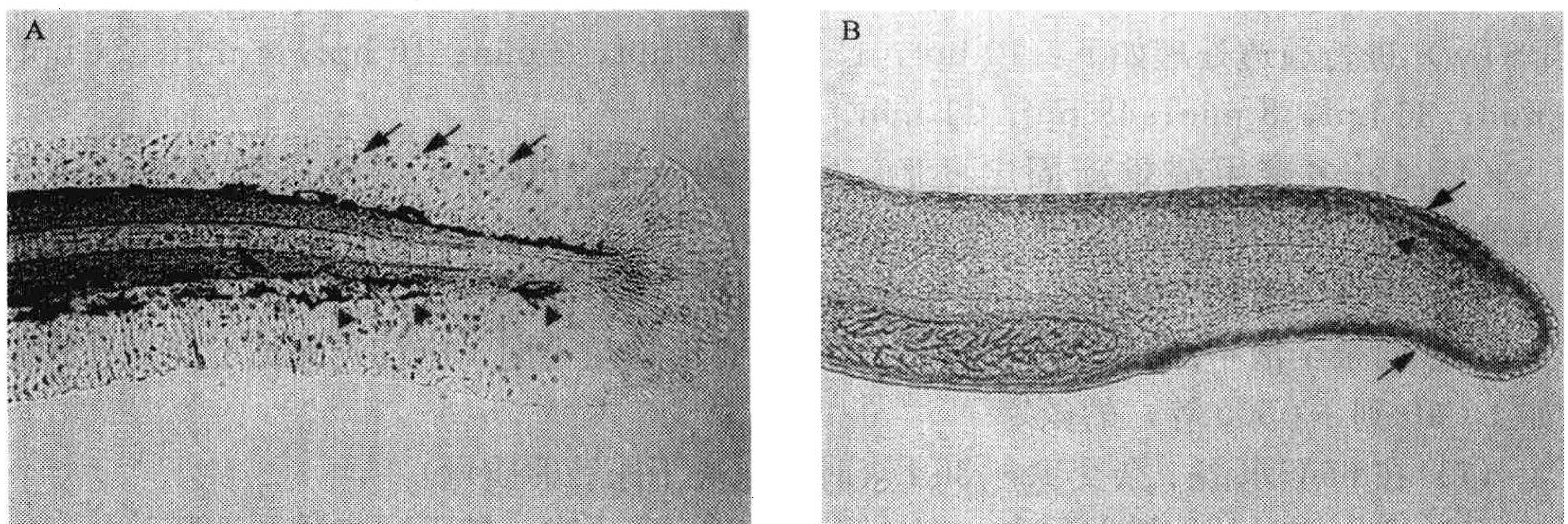


图 16.2 A. 48 hpf 斑马鱼胚胎表皮中的 BrdU 阳性细胞（箭号所指）。箭头指示载黑素细胞。B. 25 hpf 斑马鱼胚胎的 *msxB* 原位杂交图。*msxB* 在鳍褶（箭号指示）和表皮下的背部间质细胞（箭头指示）中表达。

10 min；②按照产品说明书，用坚固红和缓冲剂片配制坚固红溶液；③胚胎在坚固红溶液中室温避光孵育；染色时间视探针质量和转录表达水平而定，从 1 h 到数天不等。

（21）用 PBSTw 漂洗胚胎，再以 4%多聚甲醛固定 20 min。

3.2 免疫细胞化学

（1）在溶于 PBS 的 pH7.0 的 4%多聚甲醛［见注意事项（6）］中固定胚胎，室温放置 2 h 或 4℃过夜。

（2）PBSTw 漂洗胚胎 4 次，每次 5 min；用手工剥去绒毛膜；超过 18 hpf 的胚胎应在固定前脱膜以避免尾部卷曲。

（3）超过受精后 10 h 的胚胎应用 10 μg/ml 的蛋白酶 K（溶于 PBSTw）做通透化处理，按 3.1.2 的步骤（3）进行。

（4）加入封闭液，室温下孵育 1 h。

（5）除去封闭液，用适量稀释于封闭液的抗体替换，室温孵育 2 h 或过夜；因为抗体的质量不同，所以针对每一特定抗体，合适的稀释浓度和作用时间需要提前以野生型胚胎做预实验确定。

（6）PBSTw 漂洗胚胎三次，每次 15 min。

（7）第二抗体：加入合适稀释浓度的第二抗体［荧光素或辣根过氧化物酶结合（HRP）的］与胚胎孵育，通常按 1∶5000～1∶1000 稀释，室温 2 h。

（8）PBSTw 漂洗胚胎 4 次，每次 15 min。

（9）如果用 HRP 结合的第二抗体，在 0.1 mg/ml 的 DAB 和 0.1%过氧化氢中显色。

（10）用 PBSTw 置换 DAB 溶液停止反应，4%多聚甲醛固定 30 min，胚胎可以在甲醇中储存于－20℃。

3.3 BrdU 掺入试验（图 16.2A）

（1）用镊子手工剥去绒毛膜。

（2）用 Ringer 缓冲液稀释 BrdU 至 10 mmol/L，向 425 μl BrdU 液中加入 75 μl 二甲基亚砜（DMSO），在 6℃冰水浴中冷却 10 min。

（3）将 5～10 枚胚胎放置到微量离心管中，除去多余的溶液，加入 100 μl BrdU/DMSO 溶液，6℃冰水浴孵育 30 min。

（4）用 Ringer 缓冲液快速漂洗 5 次，将胚胎与 Ringer 缓冲液一起转移至培养皿中，放置 1～2 h。

（5）用 4%多聚甲醛固定胚胎，室温 2 h 或 4℃过夜，然后用于抗体染色。

（6）酸处理：PBS 中漂洗胚胎 3 次，在 2 mol/L HCl 中 37℃处理 1 h。

（7）用 PBSTw 漂洗，按 1∶50 将抗 BrdU 抗体稀释在封闭液中，按照抗体的说明书染色。

3.4 TUNEL 试验

（1）手工剥去绒毛膜，4%多聚甲醛固定。

（2）PBS漂洗胚胎4次，每次5 min。

（3）用含0.1%Triton X-100和0.1%枸橼酸钠的PBS处理15 min。

（4）TdT缓冲液漂洗胚胎2次，每次10 min。

（5）标记（供1 ml用）：200 μl 5× TdT缓冲液，0.5 μl地高辛配基标记的dUTP，10 μl末端转移酶，加无菌水800 μl。向胚胎中加入标记溶液，37℃温浴1 h。

（6）PBSTw漂洗胚胎4次，每次5 min。

（7）85℃处理15 min使TdT失活。

（8）加入封闭液［见2.3中的（6）］，室温下封闭1 h。

（9）除去封闭液，用1∶5000稀释于封闭液的碱性磷酸酶结合的抗地高辛配基的抗体替换。

（10）如同原位杂交，用NBT/BCIP显色。

4 注意事项

（1）山羊血清用之前应在65℃处理45 min灭活。

（2）当用产生3′伸出端的限制性内切核酸酶酶切DNA后，应该用T4 DNA聚合酶（NEB；cat. no. M0203S）处理，防止RNA聚合酶连接到3′伸出端。

（3）所有用来检测RNA探针质量的成分在用之前都需要用含0.5% SDS的100 mmol/L NaOH处理1 h，以除去RNA酶的活性。

（4）这一步可以在原位杂交玻璃管中进行，必须避光。由于有些探针反应非常迅速，而有些又可能需数日之久，所以必须密切观测染色反应，以便及时终止。

（5）对于双染色的原位杂交，建议用坚固红检测比较强的探针，因为其敏感性不如NBT/BCIP。

（6）某些抗原可能对多聚甲醛敏感，其他可替代的固定方法可以参考*The Zebrafish Book*[23]。

致　谢：原位杂交的实验方法参照C. Moens、C. Thisse、B. Thisse的实验方法改造而成。同时，感谢Hyunsook Lee提供了免疫细胞化学和BrdU掺入的实验步骤。

（李　响　齐晶晶　译　孟安明　校）

参考文献

［1］Henrikson，R. C. and Matoltsy，A. G.（1967）The fine structure of teleost epidermis. 1. Introduction and filament-containing cells. *J. Ultrastruct. Res.* **21**，194—212.

［2］Hawkes，J. W.（1974）The structure of fish skin. I. General organization. *Cell Tissue Res.* **149**，147—158.

［3］Henrikson，R. C.（1967）Incorporation of tritiated thymidine by teleost epidermal cells. *Experientia* **23**，357—358.

［4］Bakkers，J.，Hild，M.，Kramer，C.，Furutani-Seiki，M.，and Hammerschmidt，M.（2002）Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev. Cell.* **2**，617—627.

[5] Lee, H. and Kimelman, D. (2002) A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev. Cell.* **2**, 607—616.

[6] Conrad, M., Lemb, K., Schubert, T., and Markl, J. (1998) Biochemical identification and tissue-specific expression patterns of keratins in the zebrafish *Danio rerio*. *Cell Tissue Res.* **293**, 195—205.

[7] Chua, K. L. and Lim, T. M. (2000) Type I and type II cytokeratin cDNAs from the zebrafish (*Danio rerio*) and expression patterns during early development. *Differentiation* **66**, 31—41.

[8] Kimmel, C. B., Warga, R. M., and Schilling, T. F. (1990) Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* **108**, 581—594.

[9] Read, E. M., Rodaway, A. R., Neave, B., Brandon, N., Holder, N., Patient, R. K., et al. (1998) Evidence for non-axial A/P patterning in the nonneural ectoderm of *Xenopus* and zebrafish pregastrula embryos. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 763—774.

[10] Yang, A. and McKeon, F. (2000) P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 199—207.

[11] van Bokhoven, H. and McKeon, F. (2002) Mutations in the p53 homolog p63: allelespecific developmental syndromes in humans. *Trends Mol. Med.* **8**, 133—139.

[12] Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., et al. (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714—718.

[13] Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., and Bradley, A. (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708—713.

[14] Barrow, L. L., van Bokhoven, H., Daack-Hirsch, S., Andersen, T., van Beersum, S. E., Gorlin, R., et al. (2002) Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J. Med. Genet.* **39**, 559—566.

[15] McGrath, J. A., Duijf, P. H., Doetsch, V., Irvine, A. D., de Waal, R., Vanmolkot, K. R., et al. (2001) Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 221—229.

[16] Celli, J., Duijf, P., Hamel, B. C., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A. P., et al. (1999) Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* **99**, 143—153.

[17] Imboden, M., Goblet, C., Korn, H., and Vriz, S. (1997) Cytokeratin 8 is a suitable epidermal marker during zebrafish development. *Cell Biol.* **320**, 689—700.

[18] Torpey, N., Wylie, C. C., and Heasman, J. (1992) Function of maternal cytokeratin in *Xenopus* development. *Nature* **357**, 413—415.

[19] Heasman, J., Torpey, N., and Wylie, C. (1992) The role of intermediate filaments in early *Xenopus* development studied by antisense depletion of maternal mRNA. *Dev. Suppl.* 119—125.

[20] Baribault, H., Price, J., Miyai, K., and Oshima, R. G. (1993) Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes Dev.* **7**, 1191—1202.

[21] Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., et al. (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 1—36.

[22] Gaiano, N., Amsterdam, A., Kawakami, K., Allende, M., Becker, T., and Hopkins, N. (1996) Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. *Nature* **383**, 829—832.

[23] Westerfield, M. (ed.) (2000) *The Zebrafish Book*. University of Oregon Press, Eugene, OR.

第 17 章　E2F 因子在表皮细胞分化中的作用

Wing Y. Chang，Lina Dagnino

摘　要：E2F 转录因子多基因家族在调控细胞周期进程中起中心性的作用。由于同细胞的增殖与分化状态息息相关，E2F 蛋白的表达和活性受到翻译及翻译后水平上的严密调控。在本章，我们将总结原位杂交技术检测组织中 E2F mRNA 丰度的操作步骤。由于我们可以对表皮角质形成细胞进行原代培养并维持它们处于非分化或终末分化的状态，使得检测 E2F 表达和活性变化的生化和分子特征成为可能。因此，我们也将讨论采用免疫印迹方法分析 E2F 蛋白表达及采用电泳迁移率变动分析（EMSA）检测其结合培养细胞 DNA 能力的详细方法。

关键词：E2F 转录因子；表皮；角质形成细胞；增殖；分化

1　导言

表皮细胞是数量最为众多的上皮细胞类型之一，它们为机体提供了一个对抗外部环境所必需的保护性屏障。表皮属于多层鳞状上皮，并通过定向干细胞的自我复制或分化进行不断的补充[1]。表皮的最底层包含角质形成干细胞和未分化但已定向增殖的细胞。表皮的最上层和基底上层包含已终末分化、静止的角质形成细胞，负责完成皮肤的保护性屏障功能。调节细胞增殖的基本网络包括 E2F 转录因子多基因家族。E2F 的活性为 DNA 合成、S 期进程中起关键作用基因的表达所必需。在本章，我们将讲述研究表皮中及原代培养角质形成细胞中 E2F 基因表达和 DNA 结合情况的实验方案[2~4]。本章也建立了小鼠原代角质形成细胞分离培养的方法，分析 E2F 蛋白的方法也适用于小鼠和人类的细胞和（或）组织。

2　材料

2.1　原位杂交的 DNA 探针

（1）小鼠 pAlter-E2F1。

（2）小鼠 pBK-E2F2-D2。

（3）小鼠 BS-E2F3。

（4）小鼠 SK-E2F4（*Pst*I 酶消化）。

（5）小鼠 SK-E2F5。

（6）DNA 纯化试剂盒（如 Qiagen 公司产品，cat. no. 12243）。

所有的 cDNA 质粒均可用 DNA 纯化试剂盒提取，质粒可从 L. Dagnino（ldagnino

@uwo. ca）处获得。

2.2 免疫印迹所用抗体

（1）小鼠抗 E2F1 单克隆抗体（NeoMarkers MS-880）或小鼠抗 E2F1 多克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology，sc-251）。

（2）小鼠抗 E2F2 单克隆抗体（NeoMarkers MS-252）或兔抗 E2F1 抗体（Santa Cruz Biotechnology，sc-633）。

（3）兔抗 E2F3 单克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology，sc-878 and sc-879）。

（4）兔抗 E2F4 多克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology，sc-866）。

（5）兔抗 E2F5 多克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology，sc-999）。

（6）辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠 IgG（Jackson ImmunoResearch，115-035-146）。

（7）辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG（Jackson ImmunoResearch，111-035-144）。

2.3 用于电泳迁移率变动分析（electrophoretic mobility shift assays，EMSA）的寡核苷酸

（1）来源于小鼠二氢叶酸还原酶（DHFR）启动子的 E2F DNA 结合元件：DHFR-a（5′-CTA GAG CAA TTT CGC GCC AAA CTT G-3′）和 DHFR-b（5′-CAT CCA AGT TTG GCG CGA AAT TGC T-3′）。

（2）不能结合 E2F 的 DHFR 突变寡核苷酸：DHFR-c（5′-CTA GAG CAA TTT CGA GCC AAA CTT G-3′）和 DHFR-d（5′-CAT CCA AGT TTG GCT CGA AAT TGC T-3′）。

2.4 试剂

2.4.1 原位杂交

（1）DEPC 处理的蒸馏水。

（2）PBS（采用 DEPC 处理的蒸馏水配制）。

（3）胎盘 RNA 酶抑制剂（RNA guard；Invitrogen；cat. no. 15518-012）。

（4）5×NTP [ATP（Invitrogen；cat. no. 18330-019），CTP（Invitrogen；cat. no. 18331-017），GTP（Invitrogen；cat. no. 18332-015）各 55 mmol/L]。

（5）[^{33}P] -UTP（3000 Ci/mmol，Amersham Pharmacia；cat. no. AH9903）。

（6）无 RNA 酶的 DNA 酶 I（Invitrogen；cat. no. 18047-019）。

（7）酵母 tRNA（Invitrogen；cat. no. 15401-011；10 mg/ml 溶于 DEPC 水）。

（8）蛋白酶 K（Invitrogen；cat. no. 25530-015；20 mg/ml 溶于 DEPC 水，每0. 5 ml 分装后－20℃保存）。

（9）7. 5 mol/L 乙酸铵（DEPC 水配制）。

（10）20% 多聚甲醛，pH 7. 0，溶于 DEPC 水配制的 PBS（每 40 ml 分装后－20℃

保存）。

（11）用于乙酰化作用的盐酸三乙醇胺（TEA）缓冲液：把 3.72 g TEA 溶解于 200 ml DEPC 水中配制成 TEA 缓冲液，临用前加入 0.448 ml 10 mol/L NaOH。

（12）乙酸酐。

（13）杂交液：0.3 mol/L NaCl；20 mmol/L Tris-HCl，pH8.0；5 mmol/L EDTA；10 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 8.0；1× Denhardt；10%硫酸葡聚糖；0.5 mg/ml 酵母 tRNA；50%甲酰胺。此溶液可在−80℃保存 8 个月。

（14）20× SSC。

（15）感光乳剂（Kodak NTB-2 nuclear emulsion；cat. no. 1654433）。

（16）Kodak D-19 显影液和定影液（no. 146-4080）。

（17）2 号 Kodak 安全灯滤光片（Safelight Filter no. 2）及 15 W 灯泡。

（18）干燥剂。

（19）T7 RNA 聚合酶（50 U/μl，提供 5× buffer，Invitrogen；cat. no. 18033-019）。

（20）SP6 RNA 聚合酶（15 U/μl，提供 5× buffer，Invitrogen；cat. no. 18018-010）。

（21）T3 RNA 聚合酶（20 U/μl，提供 5× buffer，MBI Fermentas；cat. no. EP0101）。

（22）仅消化质粒模板一次的限制性内切核酸酶（提供 10×反应缓冲液）。

2.4.2 原代角质形成细胞的分离和培养

（1）无 $CaCl_2$ 的 MEM 培养基（如无 $CaCl_2$ 的 EMEM，Cambrex；cat. no. 06-174G）。

（2）胎牛血清（FBS）采用 Chelex 100 螯合树脂（200～400 目，钠盐，Bio-Rad Laboratories）以去除 Ca^{2+} [见注意事项（1）]。将血清和树脂（40 g 树脂/500 ml 血清）在室温下混合搅拌 1 h。先用滤纸去除树脂，再用 0.45 μm 滤膜抽滤除菌[①] [见注意事项（2）]。

（3）HICTE 添加剂的储存液：氢化可的松（500 μg/ml 溶于无水乙醇，−20℃保存），胰岛素（5 mg/ml，溶于蒸馏水，用 HCl 调 pH 至 3.0，−20℃保存），霍乱毒素（1 mg/ml，溶于蒸馏水，−20℃保存），三碘甲状腺原氨酸（T3，340 μg/ml 溶于 0.1 mol/L NaOH，−20℃保存），表皮生长因子（100 μg/ml 溶于灭菌蒸馏水，分装成单次应用剂量−20℃保存）。

（4）青霉素（100 U/ml）和链霉素（0.1 mg/ml）。

（5）角质形成细胞生长培养液：无 $CaCl_2$ EMEM，补充 8%经螯合处理的 FBS，抗生素（100 U/ml 青霉素；0.1 mg/ml 链霉素），表皮生长因子（5 ng/ml），氢化可的松（74 ng/ml），霍乱毒素（10^{-10} mol/L），胰岛素（5 μg/ml），三碘甲状腺原氨酸（6.7 ng/ml）。

（6）0.4%台盼蓝染液溶于 0.85% NaCl 中。

2.4.3 EMSA

（1）EMSA 裂解液：50 mmol/L HEPES，pH 7.7；250 mmol/L KCl；10%甘油；

---

① 原文如此，用 0.45 μm 滤膜。——译者注

0.1% NP-40；0.4 mmol/L NaF；0.4 mmol/L Na_3VO_4；0.1 mmol/L EDTA。使用前加入二硫苏糖醇（DTT，终浓度为 1 mmol/L）和蛋白酶抑制剂［0.5 mmol/L 苯甲基硫酰氟化物（PMSF）、亮肽酶素（leupeptin）、胃酶抑素（pepstatin）、胰蛋白酶抑制剂（aprotinin）各 1 μg/ml］。

（2）5× E2F 结合缓冲液：20 mmol/L HEPES，pH 7.6；50%甘油，2.5 mmol/L $MgCl_2$，40 mmol/L KCl，0.1 mmol/L EGTA，0.5 mg/ml 乙酰化牛血清白蛋白，0.5 mmol/L DTT，0.4 mmol/L 精胺。

（3）经超声和煮沸处理的鲑精 DNA（ssDNA），3～5 mg/ml。

（4）上样染液：5 μl 10× TBE，0.1%溴酚蓝，0.1%二甲苯蓝，10% Ficoll。

（5）电泳用聚丙烯酰胺凝胶：10.3 ml 丙烯酰胺/*N*，*N*′-亚甲基双丙烯酰胺（29∶1），3 ml 10×TBE，3 ml 50%甘油，43.2 ml 蒸馏水，0.48 ml 10% 过硫酸铵（新鲜配制），31.9 ml TEMED。

（6）电泳缓冲液：0.25 × TBE。

2.4.4 免疫印记分析

（1）N2 裂解缓冲液：20 mmol/L HEPES，pH 7.8；450 mmol/L NaCl，0.4 mmol/L EDTA，25%甘油，蛋白酶抑制剂（0.5 mmol/L PMSF，aprotinin、leupeptin 及 pepstatin 各 1 μg/ml；用前加入），0.5 mmol/L DTT。

（2）TBST：100 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；0.9% NaCl，0.1% Tween-20。

（3）4×样本缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl，pH 6.8；4% SDS，40%甘油，40 mmol/L DTT，0.2%溴酚蓝。

（4）5%封闭缓冲液：含 5%脱脂奶粉的 TBST。

3 方法

3.1 组织切片的原位杂交

3.1.1 组织切片

采用 8 μm 冰冻切片可获良好信号，使用前应将冰冻切片保存在－80℃［见注意事项（3）］。

3.1.2 模板的准备

（1）配制下列反应体系进行 cDNA 模板的线性化：30 μl 纯化 DNA（20～30 μg）；10 μl 10× 限制性内切核酸酶缓冲液；55 μl 蒸馏水；5 μl 限制性内切核酸酶［见注意事项（4）］。

（2）37℃ 孵育 1.5 h。

（3）取 1 μl 样本进行琼脂糖凝胶电泳以证实模板可被完全消化。如果不能，则加入 2 μl 限制性内切核酸酶，37℃ 孵育 1 h，并进行再次验证。充分酶切的模板对下步的核酸探针合成是至关重要的。

(4) 采用续贯抽提法纯化模板：Tris-HCl 平衡的苯酚，酚∶氯仿∶异戊醇（50∶45∶5，*V/V/V*），氯仿∶异戊醇。

(5) 加入 10 μl 3 mol/L NaOAc，pH 5.5，混匀，加入 250 μl 的−20℃乙醇。

(6) 在干冰中沉淀 DNA，放置 30 min 或−20℃过夜。

(7) 离心收集 DNA 沉淀（20 800 *g*，4℃，15 min）。

(8) 弃上清，缓慢加入冷 70%乙醇（−20℃）漂洗沉淀。

(9) 离心（20 800 *g*，4℃，5 min），弃上清，沉淀放置空气中干燥 5 min。

(10) 用 15 μl 经 DEPC 处理的水溶解 DNA。

(11) 在 $OD_{260/280}$ 下测定 DNA 浓度，并调节浓度至 500 ng/μl。

(12) −20℃保存。

3.1.3 核酸探针的合成与纯化

(1) 体外转录反应的进行需向微型离心管中依次加入下列试剂：6 μl 经 DEPC 处理的水，5 μl 5× RNA 聚合酶缓冲液，1 μl RNA 酶抑制剂，5 μl 5× NTP，2 μl DNA 模板（500 ng/μl），2.5 μl [^{33}P] -UTP，1 μl RNA 聚合酶（可按需要加入 T3、T7 或 SP6 RNA 聚合酶）。

(2) 37℃ 孵育 1～2 h。

(3) 加入 1 μl 无 RNA 酶的 DNA 酶 I（10 U/μl）和 1 μl RNA 酶抑制剂，37℃孵育 10 min。

(4) 加入 63 μl DEPC 水和 10 μl 3 mol/L NaOAc。

(5) 用酚/氯仿 [见注意事项（5）] 和氯仿各抽提一次。采用纯苯酚或水饱和酚。

(6) 依次加入 36.4 μl 7.5 mol/L NH_4OAc、1 μl 酵母 tRNA 和 400 μl 无水乙醇，每次加入后混匀。

(7) 在干冰中放置 20 min 或−20℃过夜，沉淀 RNA。

(8) 离心（20 800 *g*，4℃，15 min），收集沉淀，接着用 70%冰乙醇洗涤，并再次短暂离心（20 800 *g*，4℃，5 min）。

(9) 弃上清，风干沉淀 5 min，并用 50 μl DEPC 水溶解。

(10) 采用液闪计数测定 1 μl 经 10 倍稀释的 RNA 探针的比活性。

(11) 采用 DNA 测序胶电泳分离与 50 000～100 000 cpm 相对应的样本量，从而验证 RNA 探针的质量（即全长转录物中存在的实际片段）。含有小于和等于 250 bp 片段的探针往往不能产生很强的信号。

(12) 立即使用探针或在−80℃保存最多 5 d。

3.1.4 组织切片的预处理

(1) 让冰冻切片风干，并复温到室温（30 min）。

(2) 室温下用 4%多聚甲醛（PBS 配制）固定 20 min。

(3) PBS 漂洗两次，每次 5 min。

(4) 将蛋白酶 K（终浓度为 20 g/ml）溶解于含 50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5 和 5 mmol/L EDTA 的缓冲液中，用此缓冲液孵育 7.5 min [见注意事项（6）]。

(5) PBS 漂洗 5 min。

(6) 4%多聚甲醛固定 5 min，PBS 漂洗 3 min。

(7) 在进行 (4) ～ (6) 步过程中，准备乙酰化所用的 TEA 缓冲液。

(8) 向 TEA 缓冲液中加入 0.5 ml 乙酸酐，并用力混合。孵育切片 5 min，每 45～60 s 摇动切片架。另外加入 0.5 ml 乙酸酐再孵育 5 min，每 45～60 s 摇动切片架。

(9) PBS 漂洗 5 min，生理盐水 (0.9% NaCl) 漂洗 5 min。

(10) 将切片依次浸入生理盐水稀释的 30%、50%、70%、85%、95%和 100%乙醇进行脱水（每次 30 s，70% 乙醇 5～10 min)。

(11) 风干切片，立即使用或－80℃保存。

3.1.5 组织切片的杂交

(1) 将探针加热到 100℃、2 min 使其变性，并立即置冰上 5 min。变性的探针要足够多，以达到 5×10^6～2×10^7 cpm/切片。将变性的探针同杂交液混合 (100～150 μl/切片)。

(2) 用蜡笔（如使用免疫组化专用 Dako 笔）在要杂交的组织周围画一个圈。将含有探针的杂交液滴在组织上，小心地将液体在蜡笔圈内覆盖整个组织。在塑料盒内放置成排排列的、浸泡 5× SSC 标准枸橼酸盐/50%甲酰胺的 Kimmwipes® 纸巾，将切片装入盒内，55℃孵育过夜。

3.1.6 切片的杂交后处理

(1) 准备两个 65℃、37℃的水浴，所有用于漂洗的液体均需经过预热。

(2) 将切片浸入装有 5× SSC 的 50 ml 塑料管中短暂漂洗一次。将已杂交的切片放置在片架上，每一切片之间留一个空槽 [见注意事项 (7)]。用 50%甲酰胺/2× SSC 液 65℃漂洗 30 min。

(3) 用RNA 酶缓冲液 (0.5 mol/L NaCl；10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0；5 mmol/L EDTA；不要使用 DEPC 处理过的水) 37℃ 漂洗 10 min，重复两次。

(4) 用含有 20 μg/ml RNA 酶 A 的 RNA 酶缓冲液 37℃孵育 30 min。

(5) 用新鲜配制的 RNA 酶缓冲液 37℃漂洗 15 min。

(6) 用新配制的 50%甲酰胺/2× SSC 溶液 65℃持续振荡漂洗 20 min。

(7) 用 2× SSC 37℃漂洗 15 min，0.1× SSC 37℃漂洗 15 min。

(8) 将组织快速浸入用 0.3 mol/L NH_4OAc 稀释的 30%、60%、80%和 95%乙醇进行脱水，然后用 100%乙醇漂洗两次。

(9) 将切片在空气中自然风干。

3.1.7 准备感光乳剂

(1) 准备感光乳剂：将安全灯放置在距感光乳剂 4 ft* 以远的地方。准备一个 42℃的水浴，确保水位达到感光乳剂的上缘，用铝箔遮盖水浴上的指示灯。将感光乳剂置水

---

* 英尺，1 ft=0.3048 m。

浴中融化。确保所使用的玻璃和塑料器具均是清洁、无旧感光乳剂残留的。

（2）将感光乳剂缓慢倒入含等量 0.6 mol/L NaOAc 的烧杯，始终保持远离安全灯 4 ft 以上。轻轻混匀，避免产生气泡。将稀释后的乳剂分装入小的切片匣中。用铝箔纸包裹切片匣三次，4℃储存。

3.1.8 组织切片的感光乳剂覆盖与感光

（1）准备暗室：调节水浴至 42℃，将稀释后的分装感光乳剂置入使其融化（20～30 min）。准备下列物品：干燥剂（如 Dririte）、Kimwipes®纸巾、铝箔纸、切片盒、一个可以容纳切片盒的厚纸板盒、乳胶手套、固定切片用的试管架、镊子、胶带、备用的干净玻璃切片。

（2）缓慢地将两张测试用的玻璃切片浸入感光乳胶，垂直放置，用试管架固定。将测试用玻璃切片拿出暗室检查感光乳胶包被切片的情况，确认包被的乳胶上没有气泡。如果有气泡，再浸入几张测试用玻片直到看不到气泡。保持乳胶在 42℃。

（3）将玻片缓慢浸入，并在乳胶中保持 10～15 s，然后缓慢匀速（约 5 s）移出以获得均匀一致的感光乳胶包被层。将玻片垂直放置在试管架上，暗室中室温自然干燥 2～3 h。

（4）用 Kimwipes®纸巾包入适量干燥剂，放置于切片盒的两张空白玻片之间，保留足够的空间来放置已包被感光乳胶的玻片。将已包被感光乳胶的干玻片放入切片盒，关上盒子并用铝箔在外面包裹三层。将盒子装入含有干燥剂的厚纸板箱中，在 4℃可保存 2～4 周。

3.1.9 组织切片的显影和复染

（1）室温下复温玻片。

（2）准备显影液：取 250 ml 蒸馏水加热到 52℃，并加入 19.5 g 显影剂，搅拌溶解并放置冰上冷却至 16℃。

（3）准备定影液：将 Kodafix 用蒸馏水按 1∶3（V/V）稀释。

（4）将显影液、定影液、染色架、染色缸带入暗室。

（5）暗室内将切片置于染色架上，依次浸入下列溶液使其显色：显影液［16℃，2 min，见注意事项（8）］、水（30 s）、定影液（5 min）、水（彻底洗两遍）。

（6）用 0.1%甲苯胺蓝（溶解于 10 mmol/L NaOAc，pH 4.6）或苏木精/伊红对切片进行轻度复染。如果用苏木精，确保使用非酸性的试剂（如用 Harris 苏木精）以避免银颗粒的溶解。

（7）将组织切片依次浸入下列溶液脱水：水→70% 乙醇→100% 乙醇（3 min，两次）→1∶1 乙醇/二甲苯（3 min）→二甲苯（3 min，两次）。

（8）用两三滴 Permount 封片，避免形成气泡。如果对封片效果不是很满意，将玻片浸入二甲苯以移除盖玻片，并重复封片操作。

3.2 原代角质形成细胞的分离与培养

3.2.1 组织获取

（1）尽管利用 4 日龄的新生小鼠也可能获取原代角质形成细胞的培养物，但用 0～

2 日龄的小鼠能获得更理想的接种效率。皮肤取自 CO_2 安乐死的动物，取皮前动物需用聚维酮碘浸泡 5 min，70%乙醇洗两次并放置冰上。

（2）无菌条件下，切除四肢、尾巴和头。

（3）用解剖刀在动物的背部皮肤做纵向切开。

（4）自切开处用两把镊子将皮肤轻轻剥离。

（5）在新鲜配制的 0.25%胰蛋白酶中将皮肤展开使皮肤真皮面朝下漂浮，放置于 4℃ 15～20 h。确保边缘不折叠，否则皮肤不会很好地漂浮。如果角质形成细胞分离自转基因小鼠，分离的皮肤可以在 PBS 中 4℃ 储存过夜，在基因型鉴定后可以在新配制的 0.25%胰蛋白酶中 4℃孵育 15～20 h。

3.2.2 胰蛋白酶消化及角质形成细胞悬液的分离

（1）过夜孵育后，更换新的 0.25%胰蛋白酶，根据皮肤的厚度在 37℃孵育 1～1.5 h。

（2）经第二次胰蛋白酶消化，将皮肤放置在塑料细菌培养皿中，表皮面朝下，用镊子的尖端小心撕去真皮 [见注意事项（9）]。将表皮放入装有角质形成细胞生长培养基的细菌培养皿中。用剪刀将表皮剪碎并转入灭菌锥形管中。37℃轻柔振荡 15～25 min 使细胞从角化层上分离。用 70 μm 尼龙网（如 Falcon）过滤细胞悬液，取 20 μl 细胞与 20 μl台盼蓝染液混合，用血球细胞计数器测定每毫升细胞悬液的活细胞数。

3.2.3 角质形成细胞的培养

（1）将角质形成细胞以（2～3）$\times 10^5$ 个细胞/cm^2 密度接种于培养皿，可使第二天细胞铺满度接近 50% [见注意事项（10）]。37℃培养 24 h。

（2）弃去生长培养基及未黏附的细胞，更换新的培养基。此后，每 48 h 更换培养基一次 [见注意事项（11）]。

3.3 用免疫印记分析 E2F 因子

3.3.1 准备细胞提取液

（1）弃去生长培养基，用冰冷 PBS 洗培养细胞一次，在此过程中保持培养皿和细胞始终在冰上。

（2）向培养皿中加入 1 ml PBS，在冰上用细胞刮子将角质形成细胞自培养皿上轻柔刮下，用 1 ml PBS 收集细胞。将细胞悬液移入微量离心管。

（3）离心（未分化细胞 4℃ 500 *g* 离心 5 min；分化细胞 1580 *g* 离心 7～9 min），用与细胞沉淀等体积的 N2 裂解缓冲液重悬细胞。

（4）在液氮中反复冻融细胞三次。

（5）细胞碎片在微量离心管中 4℃，20 800 *g* 离心 10 min。将上清移入新管，并测定裂解产物的蛋白质浓度 [见注意事项（12）]。

3.3.2 免疫印迹

（1）准备裂解物样本。为使裂解物的蛋白质变性，加入 1/3 体积的 4×样本缓冲

液，煮沸 5 min，20 800 *g* 离心 3 min。

（2）在 9%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离，并将蛋白质转至 PVDF 膜。

（3）漂洗后，用 5%脱脂奶粉的封闭缓冲液于 22℃对膜封闭 2 h，接着用 TBST 漂洗三次，每次 10 min。

（4）将膜与感兴趣的抗 E2F 第一抗体（用含 0.1%BSA 的 TBST 稀释成 0.4 μg/ml）22℃孵育 2 h。

（5）TBST 洗膜 15 min，重复漂洗两次。

（6）将膜与稀释（用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释）至 1∶5000 的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育，接着用 TBST 洗膜 15 min，共三次。

（7）用增强化学发光法对印迹膜进行显色。

3.4 用 EMSA 分析 E2F 因子

3.4.1 探针的准备

（1）寡核苷酸的退火：双链（ds）野生型 E2F DNA-结合元件通过将 DHFR-a 和 DHFR-b 寡核苷酸退火获得。每个寡核苷酸各取 10 μg 在 1 mol/L NaCl 中混合，调整体积使 DNA 浓度为 1 μg/μl。准备一个 100 ml 的沸水水浴，将 DNA 浸入沸水中孵育 1 min，将水浴离开热源，持续孵育 DNA 至水冷却至室温。

（2）寡核苷酸的标记：取一份分装的双链寡核苷酸，稀释至 40 ng/μl。双链寡核苷酸设计时含有 5′黏性末端，可以通过 Klenow 酶的作用补齐。配制标记反应液：含40～80 ng 双链寡核苷酸，50 μCi [α^{32}P] dCTP（3000 Ci/mmol 水溶液）、dATP、dGTP、dTTP 各 25 μmol/L，4U 标记级 Klenow 酶。37℃ 孵育 10～30 min。将标记的寡核苷酸通过 G-25 葡聚糖凝胶（Sephadex）层析柱（如 G-25 Quickspin columns，Roche）纯化，采用液闪计数测定 1 μl 纯化探针的比活性。探针可立即使用或放在防护盒内－20℃储存，1～2 周内探针可保持活性。

3.4.2 细胞提取物的准备

（1）置培养皿于冰上，细胞均应在冰上进行所有操作。

（2）吸去生长培养基，用冰冷的无钙 PBS 或冰冷的 KREBS 盐水洗细胞。

（3）吸去 PBS。

（4）向每个 100 mm 培养皿内加入 1 ml 冰冷的 PBS 或 KREBS。

（5）轻轻将细胞刮下，并将其推向一角。

（6）将细胞悬液转移至离心管，4℃ 500 *g*，离心 2 min。

（7）试管置冰上，弃上清，勿搅动沉淀的细胞。

（8）加入 2～4 倍细胞沉淀体积的冰 EMSA 裂解缓冲液，彻底悬浮细胞，在冰上振荡 30 min。

（9）4℃ 20 800 *g*，离心 15 min。

（10）将上清移入干净的试管。

（11）取 1～2 μl 样本测定蛋白质浓度，剩下的提取液若立即使用可保持于冰上，

也可分装成单次使用量在−70℃保存至使用。

3.4.3 结合反应

每一结合反应均在 25 μl 体系内完成，内含 5 μl 5×结合缓冲液、60 ng/μl ssDNA、细胞裂解液（10～25 μg蛋白质）、6 ng/μl 双链突变 E2F 寡核苷酸［见注意事项（13）］，以及 20 000 cpm E2F 探针。在冰上孵育 1 h。如果需要，加入 1 μl 超转移（supershifting）抗体，在冰上再孵育 45 min。

3.4.4 电泳

结合反应用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。一般使用 5%的凝胶，凝胶在 4℃先预电泳 15 min。在结合反应物上样前，每个上样孔要经过冲洗。另外准备一组含 20 000 cpm探针的样本（不含细胞提取液）与 10 μl 上样染液混合，加入样本孔。4℃电泳凝胶，200～350 V，直至溴酚蓝到达凝胶底部（2.5～3.5 h）。

3.4.5 凝胶的处理与显影

电泳后，将凝胶转移至滤纸上，干燥，用 X 射线片曝光。

4 注意事项

（1）角质形成细胞在含小于 0.1 mmol/L Ca^{2+} 的培养基中可保持未分化状态，因此，减少 FBS 中的 Ca^{2+} 含量至关重要。补充已螯合处理的 FBS 的生长培养基 Ca^{2+} 浓度接近 0.05 mmol/L，可以很容易地通过原子吸收技术测定。

（2）血清必须进行筛选，因为它们在支持角质形成细胞的生长上具有较大差异。

（3）使用石蜡切片是可行的，它可以更好地保存组织的形态。然而，组织的敏感性可能会大大降低，这将阻碍低丰度 E2F 转录物的检测（如 E2F1）。

（4）所选择的酶应该只消化模板的一个位点（相对于目标 cDNA 的起始或末端部分），以产生正义或反义链探针。

（5）使用纯的苯酚或水饱和的苯酚，而不使用 TE 饱和的苯酚。

（6）用蛋白酶 K 消化 7.5 min 是非常重要的，缩短孵育时间可能导致探针不能充分渗透入组织，而过长的消化时间又会导致组织损失。

（7）在每张切片之间留下足够的空间，可使漂洗液充分混合，极大地提高漂洗效率，降低背景。

（8）在 2 min 的浸泡过程中，显色液的温度对避免过度显影非常关键。

（9）如果胰蛋白酶的消化恰当，表皮会黏附在塑料细菌培养皿的干燥表面，从而使其与真皮很容易分离。如果表皮和真皮分离困难，多由于胰蛋白酶消化不充分，此时应在 37℃多孵育几分钟。

（10）角质形成细胞在原代细胞培养专用的培养皿中黏附性更好（如 Primaria）。

（11）原代培养的角质形成细胞在经过数次的群体倍增后开始衰老。为获得一致的实验结果，最好使用接种后 2～5 d 的细胞。可向培养基中加入 $CaCl_2$（终浓度 0.1～

1 mmol/L）来诱导终末分化，在加入 Ca^{2+} 后 24 h 细胞即开始分化。

（12）一般情况下，需根据所检测的不同 E2F 因子和细胞类型来决定用于分析的裂解物样本量。检测角质形成细胞的 E2F1、E2F2 和 E2F3 需 100 μg 蛋白质，而检测 E2F4 或 E2F5 只要 50 μg 蛋白质就足够。

（13）双链突变 E2F 寡核苷酸由 DHFR-c 和 DHFR-d 寡核苷酸退火而成，可参照 3.3.1 的步骤进行操作。

（陈 建译 罗向东校）

参考文献

[1] Dotto, G. P. (1999) Signal transduction pathways controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **10**, 442—457.

[2] D' Souza, S. J. A., Pajak, A., Balazsi, K., and Dagnino, L. (2001) Ca^{2+} and BMP-6 signalling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 23 531—23 538.

[3] Dagnino, L., Fry, C. J., Bartley, S. M., Farnham, P., Gallie, B. L., and Phillips, R. A. (1997) Expression patterns of the E2F family of transcription factors during mouse nervous system development. *Mech. Dev.* **66**, 13—25.

[4] Dagnino, L., Fry, C. J., Bartley, S. M., Farnham, P., Gallie, B. L., and Phillips, R. A. (1997) Expression patterns of the E2F family of transcription factors during murine epithelial development. *Cell Growth Differ.* **8**, 553—563.

第 18 章　表皮中 HOX 同源盒结构域蛋白和基因转录物的分析

László G. Kömüves，Corey Largman

摘　要：HOX 同源盒结构域蛋白被认为是胚胎发育期间组织形态发育的主要调节物质。这些 DNA 结合蛋白也在成体细胞功能中扮演着多种多样的角色，有数种肿瘤被认为与 *HOX* 基因的错排有关。在这章里我们介绍了表皮中 HOX 蛋白免疫组化定位的技术方案，也提供了用原位杂交技术检测表皮中 *HOX* 基因的 mRNA 转录物的技术方案。
关键词：HOX；同源盒；同源盒结构域；表皮；皮肤；免疫组织化学；原位杂交；转录因子；基因调控

1　导言

在皮肤形成过程中，我们对皮肤形态结构进行调控的分子机制还知之甚少。在果蝇的胚胎发育过程中，*HOX* 同源盒基因是其机体形态的主要调控物质，而在哺乳动物胚胎发育过程中 *HOX* 同源盒基因对骨骼形态外观的塑形方面进行调控。目前共有 39 种人类 *HOX* 基因，已在表皮中检测出了其中许多种的 mRNA 或蛋白质产物。*HOX* 同源盒基因编码的蛋白质都包含一个由 60 个氨基酸组成的同源盒结构域基序，它是脱氧核糖核酸（DNA）结合的部位。HOX 蛋白经常与其 DNA 结合伴侣蛋白一起发挥作用，后者包括 PBX 和 MEIS 这两种同源盒结构域蛋白。在这一章里我们将回顾 HOX 蛋白及其已知的伴侣蛋白，以及其他几个在表皮细胞中也可表达的同源盒结构域蛋白。因为 HOX 同源盒结构域蛋白被认为具有起转录因子的作用，所以曾推测它们在表皮细胞中的定位是在胞核。但是我们实验室观察到在表皮细胞多数的 HOX 同源盒结构域蛋白及其他含同源盒结构域的非 HOX 蛋白通常位于胞质。因为含同源盒结构域的非 HOX 蛋白 PBX 在应答信号转导通路的过程中会从胞质转移到胞核，所以尽管还没有明确它的特性，但人们预测在上皮细胞中该蛋白质介导的分子信号转导可能在亚细胞水平调控 HOX 蛋白的定位。因此分析 HOX 蛋白在上皮各层中的空间分布，以及在正常和疾病状态下这些蛋白质的亚细胞水平定位，可能会获得关于这些蛋白质在保持皮肤稳态、调节皮肤形态结构及修复皮肤损伤过程中所起的生物学作用的信息。在这一章里，我们将详细描述研究 *HOX* 基因表达及其蛋白质产物的技术方案。这里提到的许多抗体及原位杂交试剂是我们实验室开发的，如有需要，可向我们索取。此外，商品化的 HOX 蛋白抗体正越来越多。

1.1 HOX蛋白的免疫组化定位

1.1.1 HOX蛋白显影技术方案

我们已经用过许多种在技术上有密切关系的方案，这些方案在针对发育期或成年的人及鼠上皮组织中的HOX蛋白显影时都采用了酪酰胺（tyramide）放大步骤[1~3]。与人们推测HOX蛋白是一种转录因子的假说相一致的是，*HOX*基因的表达水平和（或）其蛋白质产物的稳定性非常低，以至于到目前为止如果不利用酪酰胺来增强信号，在皮肤中是不可能检测到各种HOX蛋白的。要成功检测HOX蛋白，就要用对一抗IgG具有相应种属特异性并与过氧化物酶偶联的桥接抗体Fab片段来检测抗HOX蛋白的一抗，一抗通常用兔制备，有时也用豚鼠、鸡、大鼠制备。信号放大是通过荧光标记的酪酰胺直接沉淀或生物素化的酪酰胺沉淀来实现的，后者及其所带的生物素与后加的链亲和素偶联的过氧化物酶或碱性磷酸酶相结合形成复合物，复合物上的过氧化物酶或碱性磷酸酶可以促进比色物质或荧光物质的沉淀。通常第二个过氧化物酶的酶促反应是通过已商品化的几种ABC-过氧化物酶或ABC-磷酸酶反应系统中的一种来完成的。用各种不同的试剂来复染组织以便显示光镜下的组织形态或荧光标记的实验中的细胞核位置。在基本技术方案的阻断、检测、桥接或放大等各个步骤，我们都已成功地使用了替代试剂，我们会在相应的地方标注出这些替代试剂。列出这些替代试剂是想以此说明没有哪个技术方案是一成不变的，基于酪酰胺放大这一基本点，已经有许多种不同的试剂组合成功地应用于检测皮肤的HOX蛋白［见注意事项（1）］。

1.1.2 HOX蛋白抗体

鉴于商品化的动物饲料中角蛋白的含量很高（这会导致抗体对表皮的非特异性反应），如果使用全抗血清就会产生大量的非特异性信号，为了减少这些非特异性信号，我们用亲和吸附的方法提纯了所有用于检测皮肤中蛋白质的抗体。抗蛋白多肽的抗体通常是用固相的蛋白质提纯的，而抗小分子肽链抗原的抗体通常用固相的多肽或完整蛋白质提纯。除非另外注明，本章中提到的所有一抗都已经用亲和吸附的方法进行了提纯。现有的39种哺乳动物HOX蛋白都含有一个相对高度保守的60个氨基酸同源盒结构域。此外，HOX蛋白依据相似程度可以细分为13个旁系同源组，同一旁系同源组在同源盒结构域外还有数量不定的，有时甚至是大量的序列同源性区域［见注意事项（2）］。所以对某个特定HOX蛋白而言，要在该蛋白质上找到合适的抗原决定簇，使之具有抗血清特异性可能会很困难。研究人员必须认识到这种情况，并考虑抗体是否能够特异性识别预期的靶目标，例如，用抗同源盒结构域以外的整个215个氨基酸蛋白的抗体来特异性检测HOXB13，除了要用固相的HOXB13蛋白进行阳性亲和纯化抗体外，还需要用HOXC13和HOXD13进行阴性亲和纯化以除去有交叉反应的抗体。除了HOX同源盒结构域蛋白外，还有大量含有非HOX同源盒结构域的蛋白质。我们已经把在表皮中表达的此类蛋白质列为一个子集，其中的几个蛋白质，如PBX1、PBX2和PBX3，具有高度的氨基酸序列同源性。

1.1.2.1 HOX同源盒结构域蛋白

可以从C. Largman处获取下列（1）～（7）的抗体，其电子邮件为largman@

cgl. ucsf. edu。

（1） HOXB4：兔抗多肽抗体。

（2） HOXB6：兔抗多肽抗体。

（3） HOXB6：兔抗蛋白质抗体。

（4） HOXA9：鸡抗蛋白质抗体。

（5） HOXB9：兔抗多肽抗体。

（6） HOXB13：兔抗多肽抗体。

（7） HOXB13：兔抗蛋白质抗体。

（8） 可从 Santa Cruz Biotechnology 公司（scbt@scbt. com）获得的亲和纯化抗体有：HOXA1（N-20、C-20），HOXA2（N-20、P-20），HOXA5（N-20），HOXA7（N-18、G-20），HOXA9（N-20、A-20），HOXA10（N-20、A-20），HOXB1（N-20、S-20），HOXB2（P-20），HOXB3（S-20、C-20），HOXB4（N-18、A-15），HOXB6（S-20、G-20,），HOXD1（L-20、N-20）[见注意事项（2）]。

（9） Covance 公司（ab. products@crpinc. com）提供了几种抗 HOX 蛋白单克隆抗体和一些多克隆抗体，但仅有少部分是经亲和纯化的。

（10） Upstate Biotechnology 公司（info@upstate. com）提供一种抗 HOXA9 蛋白局部的未经亲和纯化的多克隆抗体。

1.1.2.2 非 HOX 同源盒结构域蛋白

可从 C. Largman 处获取下列（1）～（5）的抗体，其电子邮件为 largman@cgl. ucsf. edu。

（1） MEIS1：豚鼠抗蛋白质抗体。

（2） MSX1：兔抗多肽抗体。

（3） MSX1：兔抗多肽抗体。

（4） PBX2：兔抗多肽抗体。

（5） PBX2：兔抗蛋白质抗体。

（6） 可从 Santa Cruz Biotechnology 公司（scbt@scbt. com）获得以下经亲和吸附纯化的抗体（标有“x”的抗体已经成功应用于表皮组织）：PBX1（P-20）（x）、PBX2（G-20）（x），PBX3（D-17）（x），MSX-1（N-20、E-20、H-85），MSX-2（T-20、H-70、N-20），MEIS1（N-17、C-17），MEIS2（N-17）[见注意事项（3）]。

1.2 原位杂交检测 *HOX* 基因转录物

下面给出的技术方案描述了如何用地高辛配基（digoxigenin，DIG）标记的探针在石蜡切片上定位内源性 *HOX* mRNA。DIG 标记的反义 RNA 探针与靶目标结合后用结合辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）的抗 DIG 抗体（Fab 片段）检测。若要检测到微量的 *HOX* 基因转录产物，则需要使用生物素化的酪酰胺进行放大，再用与链亲和素结合的 HRP 进行二次放大。信号通过二氨基联苯胺（DAB）显色底物与 H_2O_2 显影，组织则用苏木精或其他合适的染色剂复染。内源性过氧化物酶活性会导致假阳性染色，所以每次实验都必须设一个或若干个阴性对照。此外，传统上将来自与目标模板 DNA 同源的 DNA 链转录后得到的同义 RNA 探针用 DIG 标记后与组织杂交作

为非特异性染色的又一种阴性对照，该探针与目标 mRNA 有着相同的核苷酸序列，与反义 RNA 探针的长度和 GC 组成等特性相似。然而，新的数据表明人类基因组的许多部分的转录是在两个方向上进行的[4]，该观察与我们所观察到的在表皮组织某些同义链 *HOX* 基因的转录出现了特殊的信号类型是一致的。因此，用与目标 mRNA 同源的同义 RNA 探针作为阴性对照有可能出现探针与转录自互补链 DNA 的 mRNA 特异性结合。为避免这种情况，我们采用与目标基因有着相似长度和 GC 组成的另一个 *HOX* 基因转录产生的同义探针作为对照并判断，如果该探针产生的背景染色可以忽略，则使用反义探针检测到的信号是真实信号，例如，当检测 *HOXA*4 时可以使用 *HOXA*5 同义探针作为非特异性信号的对照[5]。

1.2.1 原位杂交核糖核酸探针

有许多的实验室已经使用含有同源盒区域的核糖核酸探针来探测各种组织中的基因表达，而我们设计了不含同源盒区域的核糖核酸探针来消除同样含有这个高度保守区域的非目标 *HOX* 基因转录可能带来的非特异性交叉反应。要生产反义探针或同义对照 RNA 片段，拟检测的 cDNA 需克隆到适合的载体内，如 Bluescript（Stratagene 公司，La Jolla，CA）或其他商品化的含有 T3、T7 或 SP6 RNA 聚合酶结合位点的载体。用于制作不含同源盒区域探针的已克隆 cDNA 片段用“x”标记，均可从 C. Largman 处获取（largman@cgl. ucsf. edu）。

HOX 基因	人	鼠	已用于表皮组织表达的原位检测
A1	x	x	
A2	x	x	
A3	x		
A4	x	x	x
A5	x		x
A6	x		
A7	x	x	x
A9	x	x	
A10	x	x	
A11	x		
A13	x		
B1	x		
B2		x	
B3	x		
B4	x		x
B5	x		
B6	x	x	x
B7	x	x	x
B8	x	x	
B9		x	
B13	x	x	
C4	x	x	x

续表

HOX 基因	人	鼠	已用于表皮组织表达的原位检测
C5	x		
C6	x		
C7	x		
C8	x		
C9	x		
C10	x		
C11	x		
C12	x		
C13	x		
D1	x	x	
D3	x		
D4	x	x	
D8	x		
D9	x	x	
D10		x	
D13	x		

2 材料

2.1 免疫组织化学

（1）抗原暴露溶液（Vector，H3300）或目标抗原修复溶液（Target Retrieval Solution，Dako；cat. no. S1700）。

（2）过氧化氢（Fisher，H325-500），4℃下保存。

（3）氢硼化钠（Sigma，S9125）。

（4）左旋咪唑（Sigma，L9756）。

（5）结合 HRP 的二抗：① 结合 HRP 的亲和纯化的驴抗豚鼠 IgG F(ab′)$_2$ 片段抗体（Jackson Lab，cat. no. 711-035-152）；②结合 HRP 的亲和纯化的山羊抗兔 IgG F(ab′)$_2$片段抗体（Jackson Lab 公司，cat. no. 111-036-0030）；③其他适合的结合 HRP 的抗 IgG F(ab′)$_2$ 片段抗体。

（6）生物素化的酪酰胺溶液（信号放大催化试剂盒）（Dako，K1500）。

（7）ABC *Elite* 过氧化酶试剂盒（Vector，cat. no. PK6100）。

（8）显色剂：①DAB 试剂盒（Vector，SK4100）；注意：DAB 为可致癌物！②NBT/BCIP＋终止缓冲液（Chemicon，E-S007）；③TSA 花青 3 放大系统（Perkin-Elmer Life Sciences，NEL704A）；④TSA 花青荧光放大系统（Perkin-Elmer Life Sciences，NEL701A）。

（9）复染：① DAPI（Vectashield Mounting Medium with DAPI，Vector，H-1500）；②甲基绿（Vector，H-3402）；③核坚固红（Vector，H-3403）；④Sytox green（Molecular Probes，S-7020）；⑤苏木精（Fisher，CS400-4D）/伊红（Ricca

Chemicals，2850-16）。

（10）封闭缓冲液试剂：①牛血清白蛋白（BSA）V 组分（Sigma，A7906）；②鱼皮明胶（Sigma，G7765）。

（11）“Superfrost Plus”玻片（Fisher，12-550-15）。

（12）PAP 笔（Zymed，00-8888）。

（13）封固剂（Vector，H-1500）。

（14）TTBS 缓冲液和洗液：用双蒸水（ddH_2O）配成 10 mmol/L Tris-HCl，pH7. 6，500 mmol/L NaCl，0. 1%Tween-20。

（15）封闭缓冲液 1：取 BSA 4 g、10%鱼皮明胶储存液 5 ml，一起加入 TTBS 缓冲液至 100 ml。BSA 浓度是 4%，鱼皮明胶浓度是 0. 5%。

（16）备选封闭缓冲液：将正常山羊血清（Jackson 公司；编号 005-000-121）2 ml 或正常驴血清 2 ml（Jackson 公司；cat. no. 017-000-121）加入封闭缓冲液 1 至终体积为100 ml（依据所用的二抗制备方法选用对应的动物血清）。

（17）过氧化氢溶液：（3%，即配即用）。加入 15 ml 30%的 H_2O_2 原液（4℃下保存，Fisher 公司 H325-500），加入 ddH_2O 至终体积为 150 ml。

（18）氢硼化钠溶液：$NaBH_4$ 加入 ddH_2O 配成 5% $NaBH_4$ 溶液。

（19）ABC Elite 试剂（Vector 公司 PK6100）：链亲和素试剂（每瓶三滴）和生物素-过氧化物酶（B 瓶每瓶 3 滴），加入 100 ml 封闭缓冲液或酶促信号放大系统。过氧化物酶试剂盒（Dako；cat. no. K1500）。

（20）Sytox green 复染液：用 ddH_2O 将 5 mmol/L Sytox green 储存液稀释成终浓度为 10 nmol/L。

2. 2 原位杂交

注意：所有试剂和溶液都不含 RNA 酶，并用经 DEPC 处理的双蒸水配制。应使用新的塑料器具，或酸洗后并在 300℃高温下烘干过夜的玻璃器具。所有操作需戴手套在指定的无 RNA 酶区域内进行。

（1）DAB（二氨基联苯胺）试剂盒（Vector，SK4100），注意：DAB 为可致癌物！

（2）硫酸右旋糖酐（Sigma，D6001）。

（3）DEPC（Sigma，D5758）。

（4）地高辛配基 RNA 标记组合（Digoxigenin RNA labeling mix，Roche，1277073）。

（5）乙二胺四乙酸（EDTA；Sigma，ED255）。

（6）聚蔗糖（Ficoll，Sigma，F4375）。

（7）甲酰胺（Sigma，F9037）。

（8）月桂硫酸盐，十二烷基硫酸钠（SDS；Sigma，L4509）。

（9）聚乙烯吡咯烷酮（Sigma，PVP360）。

（10）蛋白酶 K（Roche，1-413-783）。（11）

（11）RNA 酶抑制剂（Roche，799027）。

（12）S4 DNA（超声波处理的鲑鱼精巢单链 DNA；Sigma，D7656）。

（13）SP6 RNA 聚合酶（Stratagene，600151）。

（14）乙酸钠（Sigma，S9513）。

（15）枸橼酸钠（Sigma，C7254）。

（16）焦磷酸钠（Sigma，S9515）。

（17）T3 RNA 聚合酶（Stratagene，600111）。

（18）T7 RNA 聚合酶（Stratagene，600123）。

（19）三乙醇胺（Sigma，T1377）。

（20）Triton X-100（Sigma，T8787）。

（21）酵母 tRNA（Boehringer-Mannheim，109495）。

（22）生物素化的酪酰胺（tyramide）［信号放大催化试剂盒（Dako，K1500）；见注意事项（4）］。

（23）ABC *Elite* 过氧化酶试剂盒（Vector，cat. no. PK6100）。

（24）DEPC-ddH_2O 溶液：取 0.5 ml 0.1%的 DEPC（Sigma，D5758）加到 500 ml 的双蒸水内，所用玻瓶事先需在 180℃高温下烘烤（4～6 h）；用高压处理 30 min 以除去过多的 DEPC。注意：不要先配制三氨基甲烷（Tris）溶液然后再用 DEPC 处理，而是用经过 DEPC 处理并经高压灭菌的水来配制 Tris 缓冲液。

（25）Tris-EDTA 缓冲液：在 DEPC-ddH_2O 溶液中配成 Tris 浓度为 100 mmol/L，EDTA 浓度为 50 mmol/L，pH 8.0 的缓冲液。

（26）蛋白酶 K 溶液：将 10 μl 的蛋白酶 K 原液（浓度为 20 μg/ml）加到 200 ml 的 Tris-EDTA 缓冲液中。

（27）三乙醇胺溶液（浓度 0.1 mol/L）：取 40 ml 浓度为 0.5 mol/L 的三乙醇胺用 DEPC-ddH_2O 溶液稀释到 200 ml。

（28）100× Denhardt 液：取 Ficoll 10 g、聚乙烯吡咯烷酮 10 g、BSA 10 g 溶于 DEPC-ddH_2O 溶液，配成 500 ml。

（29）S4 DNA 溶液：取 S4 DNA 50 mg，用 DEPC-ddH_2O 溶液配制成 5 ml，并用微波炉加热以溶解 DNA。

（30）20× 标准枸橼酸盐（standard saline citrate，SSC）溶液：取 NaCl 175.3 g、枸橼酸钠 88.2 g，用 DEPC-ddH_2O 溶液溶解，并用 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 7.0，制成 1 L 溶液。

（31）预杂交溶液（4× SSC，40%甲酰胺）：将 80 ml 的去离子甲酰胺加到 80 ml DEPC-ddH_2O 溶液中，然后再加入 40 ml 20×SSC。

（32）杂交溶液（含有 tRNA）（按加入的先后顺序排列）：去离子甲酰胺 2.5 ml，DEPC-ddH_2O 溶液 200 μl，100× Denhardt 液 500 μl，10%SDS 250 μl，1 mol/L Tris pH7.4 50 μl，5%焦磷酸钠 500 μl，酵母 tRNA（浓度 5 mg/ml）500 μl，20× SSC 500 μl。

（33）备选杂交溶液（含有 S4 DNA 和硫酸右旋糖酐）（按加入的先后顺序排列）：NaCl 0.58 g，DEPC-ddH_2O 溶液 0.75 ml，1 mol/L Tris-HCl pH 7.4 0.5 ml，50× Denhardt 液（含 5%SDS 和 0.5%焦磷酸钠）2 ml，甲酰胺 5 ml，50%硫酸右旋糖酐溶液 1 ml；10 mg/ml S4 DNA 溶液 0.2 ml，最后加入 DEPC-ddH_2O 溶液至 10 ml（先将 NaCl 溶于 65℃的 DEPC-ddH_2O 和 Tris-HCl 混合液，再加入 Denhardt 液，这时溶液会

变混浊，接着加入甲酰胺可以使溶液变清亮，最后加入其他试剂，并用 DEPC-ddH_2O 稀释至 10 ml）。

（34）RNA 酶 A 溶液：将 200 μl RNA 酶 A 储存液（浓度为 20 mg/ml）用 Tris-EDTA 缓冲液 200 ml 稀释。

（35）TTBS 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.6；500 mmol/L NaCl，0.1% Tween-20 的缓冲液用 DEPC-ddH_2O 溶液配成。

（36）封闭缓冲液：1%脱脂奶粉（或 4%BSA），0.5%鱼皮明胶凝胶，0.01% Tween-20，用 DEPC-ddH_2O 配制。

（37）备选封闭缓冲液：含 5%热灭活正常马血清和 2%BSA，用 TTBS 缓冲液配成。

（38）抗-地高辛苷配基-过氧化物酶抗体溶液：用封闭缓冲液稀释成1∶500的浓度。

（39）多生物素化的酪酰胺放大试剂。

（40）ABC *Elite* 过氧化酶试剂盒。

（41）DAB 底物溶液：使用前 30 min 将 1 片 DAB 溶解在 10 ml 的 TBS 液中。最终完成 DAB 底物溶液时，每 2 ml DAB 溶液中需要加入 1 滴 H_2O_2。

3 方法

3.1 HOX 蛋白的免疫组织化学检测法

承载着组织切片的载玻片在整个流程中都是用塑料玻片架装着，并浸泡到用专用玻璃或塑料容器（Tissue-Tek）盛着的特殊溶液中。本方案包括以下步骤：①准备组织及切片；②用微波修复抗原；③消除内源性酶活性/封闭自身荧光；④免疫标记；⑤信号放大；⑥过氧化物酶活性定位。

3.1.1 准备组织及切片

（1）用 4%多聚甲醛溶液（使用 PBS 稀释制备）固定组织，4℃下过夜，然后按标准流程用石蜡包埋组织。

（2）将组织切成 5～7 μm 厚的切片，并将组织切片移到“Superfrost Plus”载玻片上。在两次切割组织块之间要用无水乙醇清洗刀片以避免交叉污染。在用于展片的漂浮液中使用 ddH_2O 液漂洗，在将转换到另一组织块切片前将漂浮洗液的表面用镜头纸吸附干净。玻片要用抗溶解的标记笔标识（普通笔做的标记在脱蜡时会被洗脱）。

（3）将切片置于 55℃烤箱中过夜烘干。

（4）将切片放入微波炉内，功率调到最大挡，微波加热，每次 1 min，反复多次，直到组织周围的石蜡熔解（按每次 1 min 的话，通常需要 3 次）。

（5）将切片和玻片架一起从微波炉里取出，自然冷却（注意：玻片架很热，避免烫伤！）

（6）切片脱蜡和水化。将切片依次浸入以下溶液：二甲苯 I > 二甲苯 II > 100% 乙醇 I > 100% 乙醇 II > 70% 乙醇 > ddH_2O，每种溶液 10 min [见注意事项（5）]。

3.1.2 微波抗原修复

（1）用微波炉的塑料容器装150 ml抗原修复液（target retrieval solution或antigen retrieval solution）。将玻片架放入容器内，部分盖上容器后放入微波炉内。

（2）将另一个塑料容器装上水，用来散热。

（3）将微波炉的功率调到最大档加热：如果放了一个容器，加热5 min；两个容器加热7 min；三个容器加热10 min。

（4）用ddH_2O补足蒸发掉的液体，再对切片加热一次。

（5）取出容器（热，避免烫伤！），用ddH_2O补足蒸发掉的液体；盖上容器盖，冷却20 min。

（6）用ddH_2O漂洗玻片三次。

3.1.3 消除内源性过氧化物酶或碱性磷酸酶活性/封闭自发荧光

（1）对内源性过氧化物酶和碱性磷酸酶分别用3%过氧化氢和0.05%左旋咪唑孵育切片5 min使其失活。

（2）用ddH_2O漂洗玻片三次。

（3）如果自发荧光影响实验结果，用5%硼氢化钠孵育15～30 min，封闭非特异性自发荧光。

（4）用ddH_2O漂洗玻片三次。

3.1.4 免疫标记

除非特别说明，所有的清洗都是在室温下在水平振荡器上操作的。一抗和二抗试剂分成小等分储存于－20℃低温下，只能解冻一次。解冻后的抗体储存于4℃，可在几周内使用。

（1）玻片保存在大的组织培养皿里时进行免疫标记。培养皿的口用Parafilm封口膜覆盖。

（2）用PAP笔沿组织切片边缘画一方框，并用封闭缓冲液覆盖组织切片，孵育15 min。注意：不要让组织切片蒸发干。

（3）室温下用一抗孵育1～2 h，或4℃过夜。一抗用封闭缓冲液稀释。估算所需的稀释后的抗体量，大概每平方英寸需要200 μl抗体。最佳的抗体稀释度需要通过预实验确定。应使用最高的可能稀释度的抗体，亦即抗体浓度应尽可能低。

（4）用TTBS缓冲液洗两次，每次5 min。

3.1.5 信号放大

（1）加入与过氧化物酶结合的二抗一起孵育30 min。通过实验确定抗体稀释度，初始可做1∶250的稀释。

（2）用TTBS缓冲液洗两次，每次5 min。

（3）与生物素化的酪酰胺一起孵育5～15 min。

（4）用TTBS缓冲液洗两次，每次5 min。

(5) 与 ABC 过氧化物酶试剂一起孵育 30 min，具体按 ABC 试剂盒（Vector）说明操作。

(6) 用 TTBS 缓冲液洗两次，每次 5 min。

3.1.6 过氧化物酶活性定位（比色法）

(1) 准备好底物（DAB）缓冲液。戴上手套。因为 DAB 对光敏感，所以不要暴露于强光下。

(2) 将底物溶液加到玻片上，显微镜下监测反应。每 15～20 min 更换切片上的底物溶液，5～10 min 内应该开始出现信号。持续染色不要超过 30 min。

(3) 用玻片架装着玻片放到 ddH_2O 中清洗三次，每次 5 min，以终止反应。切片可留在 ddH_2O 中过夜。

3.1.7 过氧化物酶活性定位（荧光测定法）

(1) 加入荧光素标记的酪酰胺一起孵育 15 min。荧光素标记的酪酰胺用“Amplification Diluent”稀释，后者由“TSA direct”试剂盒提供。花青 3（Cyanine 3）标记的酪酰胺稀释成 1∶100；荧光素标记的酪酰胺稀释成 1∶75。

(2) 用 TTBS 缓冲液洗两次，每次 5 min。

3.1.8 复染，脱水，封片

(1) 用苏木精或其他合适的染料（核坚固红、Sytox Green 或 DAPI）复染 5～10 min，在水龙头下用自来水漂洗 5 min [见注意事项（6）]。

(2) 切片脱水。将切片依次浸入以下溶液：70%乙醇 > 100%乙醇 I > 100%乙醇 II > 二甲苯 I > 二甲苯 II > 二甲苯 III，每种溶液 5 min [见注意事项（5）]。

(3) 盖上盖玻片，加封固剂后放置过夜 [见注意事项（7）]。

3.2 原位杂交法定位 *HOX* mRNA

3.2.1 合成 RNA 探针

要准备 RNA 探针，必须具备感兴趣的 *HOX* 基因的 cDNA 或基因片段，并将之导入到含有病毒 RNA 聚合酶启动位点的双链克隆载体内，启动位点有助于启动所需的顺义或反义 RNA 链的合成。我们已将 *HOX* DNA 片段导入到以下载体：Bluescript 载体（含有 T3 和 T7 启动子位点，Stratagene）；pCMV（含 T3 和 T7 启动子位点，Stratagene）；pGEM 载体（含 SP6 和 T7 启动子位点，Promega 公司）；sp64 载体（含 SP6 和 T7 启动子位点，Promega）。

3.2.2 石蜡包埋的表皮组织切片中的 mRNA 定位

3.2.2.1 操作的主要步骤

(1) 准备组织和切片。

(2) 预处理切片。

（3）预杂交。

（4）探针杂交。

（5）杂交后洗涤。

（6）检测生物素标记的 RNA/RNA 杂交体。

3.2.2.2 组织和切片准备

（1）用 4%多聚甲醛溶液固定组织，然后用石蜡包埋。

（2）将组织切成 5～15 μm 厚的切片，并收集到带正电荷的载玻片上。

（3）在切片前要用无水乙醇清洗刀片以避免残留的 RNA 酶污染。

（4）展片时用 DEPC-ddH_2O 作为漂浮液。

（5）玻片要用抗溶解的标记笔标识，因为普通笔做的标记在脱蜡时会被洗脱。

（6）将切片置于 55℃烤箱中过夜烘干。

（7）切片脱蜡和水化。将切片依次浸入以下溶液：Histosolve I，Histosolve II，Histosolve III，100%乙醇 I，100%乙醇 II，100%乙醇 III，90%乙醇，70%乙醇，50%乙醇，每种溶液 5 min。

3.2.2.3 切片预处理

（1）用 DEPC-ddH_2O 漂洗玻片两次，每次 5 min。

（2）用 DEPC-ddH_2O 稀释的 1× PBS 洗玻片两次，每次 5 min。

（3）为增强组织通透性，室温下将切片与 0.3%Triton X-100 溶液（用 PBS 稀释）孵育 15 min。

（4）用蛋白酶 K 在 37℃水浴处理切片 30 min 以去除目标 mRNA 中的蛋白质。

（5）把装着玻片的片架移到一个新的容器，并用 DEPC-ddH_2O 洗两次，每次 5 min。

（6）更换容器对于避免水浴带来的 RNA 酶污染十分重要。

（7）用 0.1 mol/L 三乙醇胺缓冲液洗切片两次，每次 5 min。

（8）在 0.1 mol/L 三乙醇胺缓冲液中加入无水乙酸以乙酰化组织。

（9）向 200 ml 0.1 mol/L 的三乙醇胺缓冲液中加入 500 μl 无水乙酸，搅拌 5 min。

（10）再加入一份等量的无水乙酸，搅拌 5 min。

3.2.2.4 预杂交

（1）用含 40%甲酰胺的 4× SSC 预杂交切片，37℃水浴 1 h。

（2）从容器中取出玻片架，室温下晾干切片。

（3）用纸巾盖上玻片架以避免灰尘和其他污染。

（4）几个小时后切片就可以使用了，也可以储存过夜，甚至放置几天后再拿来杂交。

3.2.2.5 杂交

（1）把玻片拿出玻片架，擦去剩余的预杂交液。

（2）用 PAP 笔沿组织切片边缘画一方框，晾干。

（3）准备好杂交液。

（4）重悬探针原液，再离心至管底。

(5) 计算需要的探针总量，用杂交液稀释探针原液（探针原液＋杂交缓冲液＝探针溶液）。

(6) 轻轻地旋转混匀探针缓冲液，再离心。

(7) 确保使用硅化的无 RNA 酶的试管和消毒吸头。

(8) 估算需要的探针溶液总量，大概每平方英寸需要 100 μl 探针。

(9) 把探针放在 68℃ 的块状加热器内 10 min 使其变性，然后马上置于冰块上冷却。

(10) 将探针缓冲液（40～100 μl）滴到组织上，并盖上 Parafilm 盖玻片。

(11) 用无水乙醇清洗剪刀和镊子，以保持盖玻片在夹持过程中没有被 RNA 酶污染。

(12) 确保使用适当大小的盖玻片。

(13) 确保盖玻片下没有气泡。

(14) 向 SlideMoat 孵育器的小槽中加入 DEPC-ddH_2O（每个小槽加 1 ml）。

(15) 把玻片放入孵育器内杂交过夜。

(16) 最佳的杂交温度取决于使用的探针，并应通过预实验确定。通常的杂交温度介于 40℃到 55℃之间。

3.2.2.6 杂交后漂洗

(1) 注意从现在起本技术方案不再需要使用无 RNA 酶的试剂。

(2) 向容器中加入 2× SSC 液，并使用一个水平的玻片架。

(3) 从孵育器中拿出玻片并揭掉 Parafilm 盖玻片，将玻片安放到玻片架上。

(4) 将容器放到一个水平振荡器上，室温下将玻片架放入 2× SSC 液轻轻漂洗两次，每次 15 min。

(5) 37℃下 2× SSC 液轻轻漂洗两次，每次 15 min。

(6) 加入 RNA 酶 A（最终浓度是 20 μl/ml），37℃水浴下晃动 30 min，以去除未杂交的探针。

(7) RNA 酶 A 消化后，将水浴温度提升至 45℃。

(8) 45℃水浴下用 0.1× SSC 液大力晃动漂洗两次，每次 30 min。

3.2.2.7 DIG 标记的 RNA/RNA 杂交物的检测

(1) 在水平振荡器上用 TTBS 液漂洗 5 min。

(2) 将切片放于封闭液中孵育 15 min。

(3) 将切片放在水平振荡器上，用结合过氧化物酶的抗 DIG 抗体孵育 1～2 min。

(4) 用 TTBS 洗三次，每次 5 min。

(5) 用多生物素化的酪酰胺放大试剂孵育 15 min。

(6) TTBS 洗两次，每次 5 min。

(7) 用链亲和素-过氧化物酶试剂孵育 15 min。

(8) TTBS 洗 5 min。

(9) TBS 洗两次，每次 5 min。

3.2.2.8 显色［见注意事项 (8)］

(1) 非常小心地向每片组织中加入 DAB 底物，精确计时，显色 5～30 min（显色

时间取决于具体情况)。

(2) 终止显色时用 ddH_2O 漂洗数次。

(3) 切片快速脱水:①将玻片架浸入 70%乙醇 20 次;②将玻片架浸入 1 号 100%乙醇 20 次,并拿出放置 5 min;③将玻片架浸入 2 号 100%乙醇 20 次,并拿出放置 5 min;④将玻片架浸入 1 号 histosolve 20 次,并拿出放置 5 min;⑤将玻片架浸入 2 号 histosolve 20 次,并拿出放置 5 min;⑥脱水应在通风橱中操作;⑦盖上盖玻片,用 Shandon 固定剂封固,并放置过夜使固定剂粘牢。

4 注意事项

(1) 在这段文字所描述的操作流程中至少有三个地方有产生假阳性信号的可能:①组织本身的内源性过氧化物酶活性;②非特异性的自发荧光;③ABC-过氧化物酶试剂与内源性的亲和素结合成分(如生物素、肥大细胞等)的非特异性结合。内源性过氧化物酶可用过氧化氢处理消除,自发荧光可经氢硼化钠处理后减轻。在我们的实验中,使用石蜡包埋的表皮组织切片时不必太担心非特异性的内源性亲和素结合。不仅如此,免疫组化试剂还经过专门设计以抑制组织和试剂间的非特异性相互作用。要达到这个目的,我们使用一种比通常稍偏碱的高离子强度 Tris 缓冲液(pH 7.6,500 mmol/L NaCl,0.1%Tween-20)。此外,操作中总是用到一系列的对照来保证免疫反应的特异性,这些对照包括:①用同型匹配的对照 IgG 替代一抗;②在检测流程中不添加一抗;③非免疫血清,将之稀释到所含 IgG 浓度与一抗浓度相同。由于酪酰胺介导的信号放大导致敏感度的显著增加,所以一抗的最佳稀释度就成为能否成功分辨 HOX 蛋白相关信号和酪酰胺导致的背景显色增强的关键一步。最后,用数码或共聚焦显微镜检测信号时需要仔细选择检测条件(增益和对比度调整、数码图像调整等)以正确地反映信号定位。

(2) 如 1.1.2 中所述,39 种哺乳动物 HOX 蛋白有着不同程度的保守氨基酸序列同源性,要想评估某种特定的 HOX 蛋白的表达是有风险的。然而大多数 HOX 蛋白的氨基酸序列在鼠与人中有着很高的同源性,这一点经常使得研究者可以用同一种抗体去检测人和鼠表皮组织的 HOX 蛋白表达。大多数商品化的 HOX 蛋白和非 HOX 蛋白抗体被设计成尽可能减少同组织中相关 HOX 蛋白间的交叉反应性,同时又尽可能增强人与鼠的 HOX 蛋白间的交叉反应性。虽然如此,我们仍然建议仔细检查氨基酸序列的同源性以确保对目的蛋白进行可靠且特异的鉴定。

(3) 我们所用的 Santa Cruz 生产的抗 HOX 蛋白抗体中,一些用于免疫组化效果很好而另一些则较差,这种现象并没有出乎我们的意料,这可能是因为抗血清不能接触到组织中的这部分多肽抗原。Santa Cruz 生产的所有 PBX 蛋白抗血清似乎都可用于免疫组化定位。

(4) 尽管在我们所发表的研究中使用的是 DAKO 和 NEN(现在的 Perkin-Elmer)生产的酪酰胺信号放大试剂,但近来 Molecular Probes 已开始提供很多种荧光素标记的酪酰胺试剂。我们使用过这些新颖的酪酰胺试剂,实验很成功,甚至在双标和三标的研究中也是如此。

(5) 脱蜡和再水化要在化学通风橱中操作。把装着玻片的玻片架在每种溶液中蘸20次，然后在每种溶液中浸泡10 min，用梯度乙醇再水化。

(6) 苏木精染色可使较弱的核信号模糊，因此尽量浅染、不复染或换一种染色可能更好。注意选择一种恰当的核染色剂。不要使用Sytox Green加FITC或其他的绿色荧光素。

(7) 在封固剂中加入DAPI核染料很方便。

(8) 除了基于过氧化物酶的检测系统外，还有其他的备选检测系统。要注意其他酶的活性（如碱性磷酸酶）和相应的备选底物（如NBT-BCIP），可用于最后显色定位的操作步骤（见3.2.2.8）。

（唐锦明 译　刘旭盛 校）

参考文献

[1] Kömüves, L. G., Shen, W.-F., Kwong, A., Stelnicki, E., Rozenfeld, S., Oda, Y., et al. (2001) Changes in HOXB6 homeodomain protein structure and localization during human epidermal development and differentiation. *Dev. Dyn.* **218**, 636—647.

[2] Kömüves, L. G., Michael, E., Arbeit, J. M., Ma, X-K., Kwong, A., Stelnicki, E., et al. (2002) The HOXB4 homeodomain protein is expressed in developing epidermis and skin disorders and modulates keratinocyte proliferation. *Dev. Dyn.* **224**, 58—68.

[3] Kömüves, L. G., Ma, X. K., Stelnicki E., Rozenfeld, S., Oda, Y., and Largman, C. (2003) The HOXB13 homeodomain protein is cytoplasmic throughout fetal skin development. *Dev. Dyn.* **227**, 192—202.

[4] Rinn, J. L., Euskirchen, G., Bertone, P., Martone, R., Luscombe, N. M., Hartman, S., et al. (2003) The transcriptional activity of human chromosome 22. *Genes Dev.* **17**, 529—540.

[5] Stelnicki, E. J., Kömüves, L., Kwong, A. O., Holmes, D., Klein, P., Rozenfeld, S., et al. (1998) HOX homeobox genes exhibit spatial and temporal changes in expression during human skin development. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 110—115.

第19章 表皮的凋亡

Kiyofumi Yamanishi，Chun-Shen Shen，Hitoshi Mizutani

摘 要：角质化是一种特殊形式的凋亡，它产生角质层并伴随角质形成细胞的死亡。角质形成细胞的凋亡不仅发生在正常的角质化过程中，而且也出现在对细胞内外各种致死刺激（如遗传缺陷或中波紫外线）的反应中。一般而言，凋亡的特征就是染色质浓缩、胞膜起泡、细胞皱缩、凋亡小体形成和脱氧核糖核酸（DNA）断裂。缺口末端标记技术是一种检测DNA断裂的方法，有利于评定组织或细胞中是否存在凋亡细胞。本章将介绍用皮肤样本的石蜡包埋切片进行缺口末端标记的一种实用操作方法。

关键词：凋亡；角质形成细胞；表皮；缺口末端标记；TUNEL；角质化

1 导言

表皮角质形成细胞的终末分化是凋亡的一种特殊形式。在此过程的终末期，角质形成细胞死亡并成为角质化细胞。皮肤的角质层由角质化细胞组成，并作为抵御物理、化学和生物因素侵入的屏障。在正常的表皮角质化过程中，角质形成细胞的细胞核似乎突然消失在从颗粒层向角质层的转变中。凋亡以染色质浓缩、细胞膜起泡、细胞皱缩、凋亡小体形成和DNA片段化为特征[1]。在颗粒层向角质层的转变过程中很少检测到DNA片段化[2,3]。表皮角质形成细胞的凋亡不仅出现于正常的角质化过程中，而且也出现在细胞内外各种致死刺激的反应中，如遗传缺陷[4]或中波紫外线[5]。为了检测组织切片中的DNA片段化，缺口末端标识技术可应用于石蜡包埋的病理组织。本章描述了我们实验室用于检测表皮中DNA片段化的一种常规的标准方法[6]。缺口末端标记技术包括三个步骤：①蛋白酶消化以增加底物和末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）的相互接触；②TdT催化生物素-16-dUTP以标记片段化的DNA末端；③通过过氧化酶反应检测掺入的生物素-16-dUMP。

2 材料

2.1 化学试剂

（1）三羟甲基氨基甲烷（Tris；Wako Pure Chemical Industries，Ltd.，Osaka，Japan；cat. no. 204-07885）。

（2）二甲胂酸钠三水合物（Wako Pure Chemical Industries，Ltd.，Osaka，Japan；cat. no. 194-04852）。

（3）二硫苏糖醇（Wako Pure Chemical Industries，Ltd.，Osaka，Japan；cat. no.

41-08971)。

(4) 氯化钴六水合物 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan; cat. no. 036-03682)。

(5) 聚氧乙烯 (20) 失水山梨醇酐单月桂酸酯 (Tween-20) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan; cat. no. 163-11512)。

(6) 牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO; cat. no. A-7888)。

(7) 30% H_2O_2 溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan; cat. no. 086-07445)。

(8) 蛋白酶 K (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany; cat. no. 1413783)。

(9) 末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) (TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japan; cat. no. 2230A)。

(10) 1 mol/L 生物素-16-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany; cat. no. 1093070)。

(11) 亲和素-过氧化物酶 (Extravidine®-Peroxidase; Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO; cat. no. E2886)。

(12) 3, 3′-二氨基联苯胺四盐酸片 (DAB · 4HCl 10 mg/片) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan; cat. no. 049-22831)。

(13) 苏木精溶液：迈尔氏苏木精明矾染色液 (Merck, Darmstadt, Germany; cat. no. 109249)。

(14) 透明封片剂 (Crystal/mount) (Crystal/mount; Biomeda, Foster City, CA; cat. no. MO2)。

2.2 反应物

(1) DN 缓冲液：30 mmol/L Tris-HCl, pH7.2, 140 mmol/L 二甲胂酸钠, 4 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mmol/L 二硫苏糖醇 [见注意事项 (1)]。此溶液在 −20℃可保持稳定至少 1 个月。

(2) 2TdT 缓冲液：30 mmol/L Tris-HCl, pH7.2, 140 mmol/L 二甲胂酸钠, 1 mmol/L $CoCl_2$。此溶液在 −20℃可保持稳定至少数月。

(3) TB 缓冲液：300 mmol/L 氯化钠, 30 mmol/L 枸橼酸钠。高压灭菌后，室温下溶液可保持稳定数月。

(4) 蛋白酶 K 溶液：用 20%甘油将蛋白酶 K 稀释至 20 μg/ml，保存于 −20℃。

(5) TdT 反应混合物：用 TdT 缓冲液配制 0.1 U/μl TdT 和 10 μmol/L 生物素-16-dUTP 的混合物。用 TdT 缓冲液将 1 mmol/L 生物素-16-dUTP 稀释到 10 μmol/L，将 TdT 稀释到 0.1 U/μl。临用前配制。

(6) PBS-Tween-20 溶液：用无菌的无 Ca^{2+}-Mg^{2+} PBS 配制 0.05% Tween-20，室温保存溶液。

(7) BSA 溶液：用无菌的 PBS 配制 2% BSA 溶液。使用前配制。

(8) 亲和素-过氧化物酶溶液：用蒸馏水将亲和素-过氧化物酶稀释至 1∶500。使用

前配制。

(9) DAB溶液：将一片DAB片放入50 ml的0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 中，充分溶解，然后加入10 μl的30% H_2O_2溶液。使用前配制。

2.3 其他材料

(1) APS包被过的载玻片 (Superfrost® APS-coated glass slides; Matsunami Glass, Ltd., Kishiwada, Japan; cat. no. S8441)。

(2) 蜡笔：PAP笔 (DAKO Pen; DakoCytomation, Glostrup, Denmark; cat. no. S2002)。

(3) 孵育盒 (Cosmo Bio Co., Ltd. Tokyo, Japan; cat. no. 20CG)。

3 方法

3.1 准备组织

用4%多聚甲醛缓冲溶液固定组织过夜，石蜡包埋。将厚度为4～6 μm的组织切片封固于APS包被过的载玻片上。

3.2 脱石蜡

(1) 二甲苯，三次，每次5 min。

(2) 丙酮，5 min。

(3) 用蜡笔在样本切片周围画圈，风干。

(4) 在梯度乙醇中水化：100%乙醇3 min，90%乙醇3 min，80%乙醇3 min，70%乙醇3 min。

(5) 蒸馏水漂洗切片三次，每次5 min。

3.3 TdT介导的dUTP-生物素缺口-末端标记 (TUNEL) 反应

(1) 20 μg/ml蛋白酶K处理载玻片15 min。

(2) 蒸馏水漂洗三次，每次5 min。

(3) 2% H_2O_2浸泡载玻片5 min。

(4) 蒸馏水漂洗载玻片三次，每次5 min [见注意事项 (2)]。

(5) TdT缓冲液中浸泡载玻片5 min。

(6) 将TdT反应混合物加到载玻片上，在密闭的湿化盒中37℃孵育60 min [见注意事项 (3)、(4)]。

(7) TB缓冲液中浸泡载玻片5 min以终止反应。

(8) 蒸馏水漂洗载玻片三次，每次5 min。

(9) 将载玻片浸没于PBS-Tween-20的溶液中5 min。

(10) 每张载玻片加100 μl BSA溶液孵育10 min。

(11) 蒸馏水漂洗载玻片三次，每次5 min。

(12) PBS 浸泡载玻片 5 min。

(13) 每张载玻片加 100 μl 亲和素-过氧化物酶，37℃孵育 30 min。

(14) 蒸馏水漂洗载玻片三次，每次 5 min。

(15) PBS 浸泡载玻片 5 min。

3.4 显色和封片

(1) 在载玻片上加 DAB 溶液，显微镜下观察其显色反应 [见注意事项 (5)]。

(2) 当达到适当的显色颜色时，先用自来水漂洗载玻片，再用蒸馏水浸泡 1 min。

(3) 苏木精溶液染色 2 s。

(4) 自来水漂洗载玻片，蒸馏水浸泡 1 min。

(5) 用适量的透明封片剂 (Crystal/mount) 封片 [见注意事项 (6)]，室温下放置玻片过夜。

(6) 光学显微镜下观察染色效果 (图 19.1)。

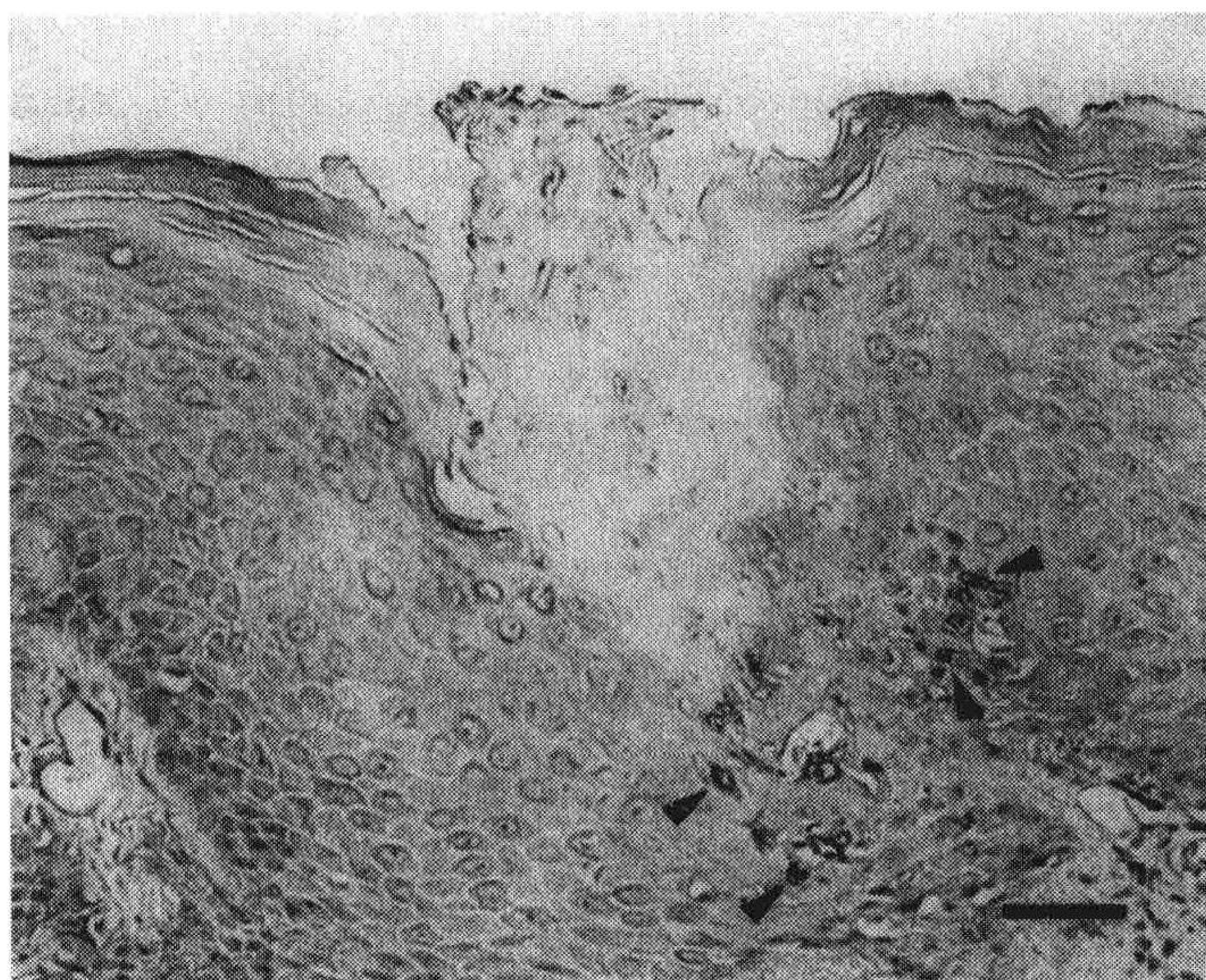


图 19.1 TUNEL 法检测表皮的细胞凋亡

箭头所示为汗孔角化病中 TUNEL 阳性的凋亡表皮细胞。标尺，50 μm。

4 注意事项

(1) 二甲胂酸钠是剧毒物质。为安全起见，必须进行适当的操作和处置。

(2) 孵育盒底部放置用 PBS 浸湿的滤纸一张。

(3) 制备阳性对照。在 3.3 的步骤 (4) 和 (5) 之间，用 DNA 酶处理 DNA，步骤如下：在 DN 缓冲液中浸没载玻片 5 min，再用 DNA 酶 I 溶液 (DN 缓冲液配制 5000 U/ml) 处理载玻片 10 min。蒸馏水漂洗载玻片三次，每次 5 min。

（4）阴性对照：即必须同时进行无 TdT 酶的 TUNEL 反应。

（5）陈旧石蜡包埋组织的细胞核可能由于 DNA 链自发断裂而出现非特异性的 TUNEL 染色阳性，这种情况下所有的细胞核都呈阳性。

（6）为了避免组织切片周围的气泡残留，用透明封片剂（Crystal/mount）封片时不要使用盖玻片。

（朱崇涛 译 彭代智 校）

参考文献

[1] Kerr, J. F. R. and Harmon, B. V. (1991) Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective, in *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death* (Tomei, L. D. and Cope, F. O., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 5—29.

[2] McCall, C. A. and Cohen, J. J. (1991) Programmol/Led cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 111—114.

[3] Gandarillas, A., Goldsmith, L. A., Gschmeissner, S., Leigh, I. M., and Watt, F. M. (1999) Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp. Dermatol.* **8**, 71—79.

[4] Bongiorno, M. R. and Arico, M. (2002) The behaviour of Bcl-2, Bax and Bcl-x in Darier's disease. *Br. J. Dermatol.* **147**, 696—700.

[5] Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T. A., et al. (1998) Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell. Biol.* **140**, 171—182.

[6] Shen, C. S., Tabata, K., Matsuki, M., Goto, T., Yokochi, T., and Yamanishi, K. (2002) Premature apoptosis of keratinocytes and the dysregulation of keratinization in porokeratosis. *Br. J. Dermatol.* **147**, 498—502.

第 20 章　桥粒蛋白在凋亡表皮细胞中的命运

Jörg Weiske，Otmar Huber

摘　要：在表皮细胞中，桥粒是基底侧的细胞和细胞之间连接的关键点，在表皮的自身稳定中起着重要的作用。过量或受损的细胞通过凋亡被机体排出。为了从组织中清除凋亡细胞，细胞间的连接被打断。本实验方案详细地描述了对凋亡细胞中桥粒蛋白的分析。
关键词：凋亡；桥粒芯糖蛋白（desmoglein）；桥黏素（desmocollin）；桥斑蛋白（desmoplakin）；斑菲素蛋白（plakophilin）；中间丝

1　导言

凋亡是一个高度保守的生物过程，清除不需要的或受损细胞，在多细胞生物体的生长发育和维持内环境稳定中起重要作用。不适当的凋亡或受损的凋亡已涉及包括肿瘤在内的许多人类疾病的发生和发展[1~3]。许多观察认为凋亡在表皮生物学中起着重要作用[4]。

凋亡细胞的死亡会在细胞形态学上诱发显著的分子改变，如细胞膜起泡、细胞质/细胞核浓缩、失去细胞与细胞间连接。大多数形态学的改变是由于凋亡细胞内一系列半胱氨酸蛋白水解酶被激活所致。这些蛋白酶是一类被称为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（简称为半胱天冬酶，caspase）家族的成员。半胱天冬酶在进化上高度保守，能特异性裂解基质蛋白 C 端天冬氨酸残基[5]。凋亡时所见到的形态学变化，部分是缘于对细胞与细胞间连接的影响。因此，上皮细胞黏着点的钙黏素-连环蛋白黏附复合体的组分就成为半胱天冬酶的作用靶点[6,7]。桥粒代表着第二种类型的钙黏素介导的细胞与细胞间连接，尤其是锚定在中间丝系统上的上皮细胞。人类皮肤病的分子病理学，以及桥粒组分已发生遗传学改变的动物模型的特征，揭示了桥粒对组织形成和维持的重要作用。桥粒有多种组成成分，形成复杂的蛋白质网络。这些蛋白质属于 3 个家族：桥粒钙黏素（桥黏素 1～3 和桥粒芯糖蛋白 1～4）、犰狳重复（armadillo repeat）蛋白家族（桥粒斑珠蛋白和桥粒斑菲素蛋白 1～3）和斑素家族蛋白（桥斑蛋白、周质斑素、壳斑蛋白和网格蛋白）。桥粒蛋白复合物的分子结构在近年来的综述中已被概述[8~11]。本章将述及分析桥粒蛋白在凋亡上皮细胞中命运的详细实验方案。

2　材料

2.1　细胞

HaCaT——一种自发永生化的非致瘤性的角质形成细胞系（从 Dr. Norbert

Fusenig：n. fusenig@dkfz-heidleberg. de 获取）[见注意事项（1)]。

2.2 用于细胞培养的塑料和玻璃器皿

（1）100 mm×20 mm 组织培养皿（Falcon/Becton-Dickinson；cat. no. 3003)。

（2）35 mm 组织培养皿（Falcon/Becton-Dickinson；cat. no. 3001)。

（3）Multiwell™ 6 孔组织培养板（Falcon/Becton-Dickinson；cat. no. 3046)。

（4）Nunc CryoTube™冷冻管（Nunc；cat. no. 377267)。

（5）血清学移液管（Falcon/Becton-Dickinson)。

（6）15 ml 离心管（Nunc；cat. no. 366079)。

（7）50 ml 离心管（Nunc；cat. no. 373687)。

（8）细胞刮铲（Costar®；cat. no. 3008)。

（9）改良的牛鲍氏血细胞计数板（VWR international，cat no. 631F1110)。

（10）Nicool LM10 冷冻仪（VWR international，cat no. 478C3003）[见注意事项（2)]。

2.3 培养基和试剂

（1）含有 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐溶液（PBS+）（PBS+；PAA Laboratories GmbH；cat. no. H15-001 or GibcoBRL；cat. no. 14040-091)。

（2）不含 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐溶液（PBS−）（PBS−；PAA Laboratories GmbH；cat. no. H15-002 or GibcoBRL；cat. no. 14190-094)。

（3）Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（PAA Laboratories GmbH；cat. no. E15-810 or GibcoBRL；cat. no. 31966)。

（4）青霉素-链霉素（GibcoBRL；cat. no. 15140-122)。

（5）二甲基亚砜（DMSO）Hybri Max®（Sigma；cat. no. D2650)。

（6）胎牛血清（Biochrom AG Seromed®；cat. no. S0115）[见注意事项（3)]。

（7）胰蛋白酶/乙二胺四乙酸（EDTA）(0.25% [m/V] 胰蛋白酶、1 mmol/L EDTA）(GibcoBRL；cat. no. 25200-056)。

2.4 抗体

（1）抗桥粒芯糖蛋白-3 抗体（clone 62)，直接针对桥粒芯糖蛋白-3 的细胞质内区域（BD Transduction Laboratories；cat. no. D28120)。

（2）抗桥粒芯糖蛋白-3 抗体（clone 5H10)，直接针对桥粒芯糖蛋白-3 的细胞外区域（获赠于 Dr. Masayuki Amagai；amagai@sc. itc. keio. ac. jp)。

（3）抗桥黏素-3 抗体（clone Dsc3-U114；Progen；cat. no. 65193)。

（4）抗桥斑蛋白 1 和 2 抗体（clone 2.15；Progen；cat. no. 61003)。

（5）抗桥粒斑菲素蛋白-1 抗体（clone 670)，直接针对 Arm-重复区域（获赠于 Dr. Mechthild Hatzfeld；mechthild. hatzfeld@medizin. uni-halle. de)。

（6）抗细胞全角蛋白抗体（Progen；cat. no. 10550)。

（7）过氧化物酶结合的亲和纯化的 F（ab′)$_2$ 片段山羊抗鼠 IgG（H+L）(Diano-

va；cat. no. 115-036-062)。

(8) 过氧化物酶结合的亲和纯化的 F (ab′)$_2$ 片段山羊抗兔 IgG (H+L) (Dianova；cat. no. 111-036-045)。

(9) Alexa Fluor® 594 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) (MOL/Lolecular Probes；cat. no. A-11012)。

(10) Alexa Fluor® 488 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L) (MOL/Lolecular Probes；cat. no. A-11029)。

(11) 抗多聚 (ADP-核糖)-聚合酶 (PARP) (Roche Applied Science；cat. no. 1835238)。

(12) M-30 细胞-死亡 (Roche Applied Science；cat. no. 2140322)。

2.5 凋亡的诱导

(1) 十字孢碱 (Sigma；cat. no. S5921)；储存液：0.5 mmol/L，用二甲基亚砜 (DMSO) 配制，−20℃保存，有效期两年。

(2) 喜树碱 (Sigma；cat. no. C9911)；储存液：2 mg/ml，用 DMSO 配制，−20℃保存，有效期两年。

(3) 肿瘤坏死因子-α (Biomol；cat. no. 50435)；储存液：10 μg/ml，用含 5%牛血清白蛋白的 PBS 溶液配制，−20℃保存，有效期两年。

(4) 抗 CD95 抗体 (clone CH-11) (Immunotech；cat. no. 1504)，储存液为500 μg/ml 的 PBS/甘油溶液。纯液态形式应保存在−20℃，可保存至管壁上的失效期前。

(5) 半胱天冬酶-3-抑制因子-2 (Z-DEVD-FMK；Calbiochem®；cat. no. 264155) 储存液：50 mmol/L 的二甲基亚砜溶液，分装后于−20℃保存，有效期一年。

(6) 基质金属蛋白酶抑制因子-1 (MMP inhibitor I) (Calbiochem®；cat. no. 444250)；储存液：100 mmol/L 的二甲基亚砜溶液，分装后于−20℃保存，有效期一年。

2.6 桥粒蛋白质溶解

(1) BCA 蛋白测定系统 (Pierce；cat. no. 23225)。

(2) 尿素 (VWR international；cat. no. 108488)。

(3) Complete™-EDTA 蛋白酶抑制因子混合物 (Roche Applied Science；cat. no. 1697498)。

(4) 裂解缓冲液：10 mmol/L 咪唑，pH 6.8；100 mmol/L 氯化钾，300 mmol/L 蔗糖，2 mmol/L 氯化镁，10 mmol/L 乙二醇四乙酸，1 mmol/L 氟化钠，1 mmol/L 钼酸钠 (Na_2MoO_4)，1 mmol/L 偏钒酸钠 ($NaVO_3$)，0.2% (*V/V*) 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100)，Complete™-EDTA 蛋白酶抑制因子混合物。4℃保存，并在一周内使用。

2.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) Rotiphorese® 凝胶 30，30%丙烯酰胺/0.8% (*m/V*) 双丙烯酰胺 (Roth；cat. no. 3029.1)。

(2) 过硫酸铵 (APS) (Roth；cat. no. 9592.3)。

（3）四甲基乙二胺（TEMED）（Roth；cat. no. 2367. 3）。

（4）1. 5 mol/L Tris-HCl，pH 8. 8。

（5）0. 5 mol/L Tris-HCl，pH 6. 8。

（6）10%（*m/V*）SDS。

（7）4× SDS 样本缓冲液：0. 1 mol/L Tris-HCl，pH 6. 8；8%（*m/V*）SDS；40%（*m/V*）甘油；20%（*m/V*）β-巯基乙醇；0. 4 mg/ml 溴酚蓝（Merck；cat. no. 111746）。分装后−20℃保存。工作液可室温保存数月［见注意事项（4）］。

（8）Prestained™标准蛋白（如：GibcoBRL；cat. no. 10748-010）。

（9）异丙醇。

（10）电泳缓冲液：24. 8 mmol/L Tris，192 mmol/L 甘氨酸，0. 1%（*m/V*）SDS。室温保存。

（11）电泳仪（如：C. B. S. Dual Vertical Mini Gel），1. 5 mm 间隔，玻璃板和梳子。

（12）恒流电源（如：Biometra Power Pac P25；Bio-Rad Power Pac 200）。

2. 8 半干法电印迹

（1）聚偏氟乙烯（PVDF）转移膜（PolyScreen®，Perkin-Elmol/Ler Life Sciences；cat. no. NEF1002）。

（2）Whatman 3 MM 滤纸（Whatman® International Ltd.；cat. no. 1003-917）。

（3）阳极缓冲液 1：300 mmol/L Tris-HCl，pH 9. 4；室温保存。

（4）阳极缓冲液 2：30 mmol/L Tris-HCl，pH 9. 4；室温保存。

（5）阴极缓冲液：25 mmol/L Tris-HCl，pH 9. 6；40 mmol/L ε-氨基-*N*-己酸；0. 1%（*m/V*）SDS；室温保存。

（6）半干法转移印迹装置（如：Bio-Rad Trans Blot SD Semidry-Transfer Cell；cat. no. 170-3940）。

（7）恒流电源（见 2. 7①）。

2. 9 免疫检测

（1）TST 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH7. 5；150 mmol/L 氯化钠；0. 1%（*V/V*）Tween-20；室温保存。

（2）Lumi-Light 免疫印迹底物（Roche Applied Science；cat. no. 2015200）。

（3）Biomax MR 膜（Eastman Kodak Company；cat. no. 8941114）。

2. 10 免疫沉淀

（1）蛋白 A 琼脂糖凝胶® CL-4B（Amersham Biosciences；cat. no. 17-0963-03），1∶1 搅动加入 CSK 缓冲液，0. 2%（*m/V*）牛血清白蛋白；4℃保存。

（2）CSK 缓冲液：10 mmol/L 咪唑，pH 6. 8；50 mmol/L 氯化钠；300 mmol/L 蔗

① 原文误为 2. 6，但 2. 6 未涉及恒流电源。——译者注

糖；3 mmol/L 氯化镁；0.5%（V/V）聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）；4℃保存。

（3）2× SDS 样品缓冲液：65 mmol/L Tris-HCl，pH 6.8；3%（m/V）SDS；30%（m/V）甘油；5%（V/V）β-巯基乙醇；0.4 mg/ml 溴酚蓝。分装后，−20℃保存。工作液可在室温下保存数月［见注意事项（4）］。

2.11 免疫荧光

（1）含0.1%（m/V）明胶（Sigma；cat. no. G2500）的PBS溶液：溶液高压灭菌，室温保存。

（2）甲醇；−20℃保存。

（3）盖玻片 18 mm×18 mm 或 22 mm×22 mm；用前高压灭菌，或将其用乙醇浸泡后火焰消毒。

（4）载玻片（76 mm×26 mm）。

（5）3.7%（m/V）多聚甲醛（Merck；cat. no. 818715）。将 3.7 g 多聚甲醛加入 80 ml PBS 中，加热至 80℃，不断搅拌直至完全溶解。加入 10 μl 1 mol/L 氯化钙和 10 μl 1 mol/L 氯化镁。调节 pH 至 7.4，用 PBS 定容至 100 ml。分装后−20℃保存，有效期 6 个月。每次实验均更换分装液［见注意事项（5）］。

（6）封闭液：PBS+，0.1%（V/V）山羊血清。

（7）PBS+/甘氨酸：PBS+，25 mmol/L 甘氨酸。

（8）ProTaqs 封固荧光素（BIOCYC；cat. no. 401603095）。

（9）山羊血清（Sigma；cat. no. G6767）。

（10）荧光显微镜（Axioplan，Zeiss）。

（11）共聚焦显微镜 LSM510（Zeiss）。

2.12 GST-标记的桥粒芯糖蛋白-3 胞质区的重组表达及纯化

（1）大肠杆菌 XL1-blue 感受态细菌。

（2）pGEX4T-1-hDsg3$_{cyto}$：编码 GST-人桥粒芯糖蛋白-3 胞质区的融合蛋白的原核表达载体。

（3）水浴箱。

（4）异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（Isopropyl-β-D-thio galactopyranoside，IPTG）（AppliChem；cat. no. A1008.0025）；储存液：1 mol/L IPTG 的水溶液，过滤除菌后−20℃保存。

（5）超声破碎器（如 Sonifier Cell Disrupter B12，Branson Power Company Danbury）。

（6）垂直电泳仪（如 SE600 Series，Hoefer），1.5 mm 间隔和梳子。

（7）Visking 透析膜，截留分子质量为 14 kDa（Roth；cat. no. 1780.1）。

（8）考马斯亮蓝 R250（Merck；cat. no. 102085）。

（9）谷胱甘肽-琼脂糖（Sigma；cat. no. G4510）。

（10）还原型谷胱甘肽（Sigma；cat. no. G6013）。

（11）具活性的纯化重组人半胱天冬酶-3（caspase-3）（BD Pharmingen；cat. no. 66281V）。

(12) 丙烯酰胺（Roth；cat. no. 7906. 2）。

(13) N，N'-次甲基-双-丙烯酰胺（双丙烯酰胺）（Roth；cat. no. 7867. 1）。

(14) Fluorotrans 转印膜（PVDF membrane；0. 2 μm；Fluka；cat. no. 15290）。

(15) Whatman 3MM 滤纸（Whatman® International Ltd. ；cat. no. 1003-917）。

(16) 半干转移印迹（见 2. 8）。

(17) 恒流电源（见 2. 7）。

(18) TEMED（Roth；cat. no. 2367. 3）。

(19) Poly-Prep®层析柱（Bio-Rad Laboratories；cat. no. 731-1550）。

(20) 1. 5 mol/L Tris-HCl，pH 8. 8。

(21) 0. 5 mol/L Tris-HCl，pH 6. 8。

(22) 10%（m/V）SDS。

(23) 4×SDS 样品缓冲液：0. 1 mol/L Tris-HCl，pH 6. 8；8%（m/V）SDS；40%（m/V）甘油；20%（m/V）β-巯基乙醇；0. 4 mg/ml 溴酚蓝。分装后－20℃保存。工作液可室温保存数月［见注意事项（4）］。

(24) Prestained™标准蛋白（如 GibcoBRL；cat. no. 10748-010）。

(25) 异丙醇。

(26) 电泳缓冲液：24. 8 mmol/L Tris，192 mmol/L 甘氨酸，0. 1%（m/V）SDS；室温保存。

(27) 后续 Edman 测序法用的印迹缓冲液（用前现配）：

阳极缓冲液：50 mmol/L 硼酸/氢氧化钠-缓冲液，pH 9. 0。

阴极缓冲液：50 mmol/L 硼酸/氢氧化钠-缓冲液 pH 9. 0，0. 1%（m/V）SDS，10%（V/V）甲醇。

PVDF 缓冲液：50 mmol/L 硼酸/NaOH-缓冲液，pH 9. 0，10%（V/V）甲醇。

(28) 2×半胱天冬酶-缓冲液：40 mmol/L Pipes，pH 7. 2；200 mmol/L 氯化钠；20 mmol/L 二硫苏糖醇；2 mmol/L EDTA；0. 2%（m/V）CHAPS；20%（m/V）蔗糖；4℃保存。

(29) Benchmark™标准蛋白（如 Gibco-BRL；cat. no. 10747-012）。

(30) LB 培养基：1%（m/V）细菌培养用胰蛋白胨，5%（m/V）细菌培养用酵母提取物，86 mmol/L 氯化钠，pH 7. 5。

(31) LB-氨苄青霉素培养基：含 1. 5%（m/V）琼脂的 LB 培养基，50 μg/ml 氨苄青霉素。

(32) 裂解缓冲液：PBS+，Complete™-EDTA 蛋白酶抑制剂，用前现配。

(33) 洗涤缓冲液：PBS+，0. 5%（V/V）TritonX-100，用前现配。

(34) 洗脱缓冲液：PBS+，20 mmol/L 谷胱甘肽，用前现配。

3 方法

3. 1 细胞培养

HaCat 细胞接种在含有 10%（V/V）胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链

霉素的 DMEM 培养基中。

3.1.1 细胞复苏

（1）将细胞从液氮容器中取出，迅速在 37℃水浴中解冻。

（2）将细胞悬液转移至盛有 20 ml 预热细胞培养基的 50 ml 无菌锥形离心管中。

（3）室温下 310 *g* 离心 5 min。弃去培养基，加入 10 ml 培养基，轻轻吹打重悬细胞。

（4）将细胞悬液接种到 100 mm 细胞培养皿中，37℃，5%CO_2 大气压。每天更换培养基直至细胞铺满。

3.1.2 HaCaT 细胞传代

（1）弃去培养基，用 10 ml 预热的 PBS 冲洗细胞两次。

（2）向培养皿中加入 5 ml 胰蛋白酶-EDTA 溶液。

（3）37℃孵化 5～10 min，在显微镜下观察细胞分离情况。

（4）为形成单细胞悬液，将剩余的细胞聚集物轻轻上下吹打。按 3.1.1 所述方法洗涤细胞。

（5）在改良的牛鲍氏血细胞计数板（Neubauer chamber）上计数，将（0.5～1）×10^6 个细胞加入 10 ml 培养基中并接种于 100 mm 培养皿中。每 24 h 更换培养基。

3.1.3 细胞冻存

（1）配制细胞冻存液：10%（*V/V*）DMSO，20%（*V/V*）胎牛血清，70%（*V/V*）细胞培养基。

（2）按 3.1.2 所述制备单细胞悬液。

（3）室温下，将 100 mm 培养皿中的细胞以 310 *g* 离心 5 min。用 1 ml 冻存液轻柔重悬细胞，并转入冷冻管。

（4）在 Nicool LM10 冷冻机里冻存细胞（30 min，3 级；10 min，10 级）。

（5）立刻将冷冻管转入液氮罐保存。

3.2 蛋白质印迹分析凋亡表皮细胞的桥粒蛋白

这一部分实验描述 HaCaT 细胞凋亡的诱导，然后用蛋白质印迹法分析桥粒蛋白凋亡分解的产物。

3.2.1 诱导细胞凋亡

（1）将 1×10^6 个细胞接种在 35 mm 细胞培养皿中，培养 20 h。

（2）弃去培养基，用 10 ml 预热的 PBS+冲洗细胞。

（3）加入 2 ml 新鲜培养基，并补充 4 μl 十字孢碱或 2 μl 喜树碱来诱导凋亡［见注意事项（6）］。

（4）为研究抑制因子，可预先培养细胞，例如，先在 2 ml 培养基中加入 50 μmol/L 半胱天冬酶抑制剂 Z-DEVD-FMK 和（或）100 μmol/L 基质金属蛋白酶抑制因子

MMPI-1培养 30 min，然后再添加 4 μl 十字孢碱或 2 μl 喜树碱诱导凋亡。

(5) 用仅添加 DMSO 的培养基作为对照，但 DMSO 的终浓度不能超过 0.5% (*V*/*V*)。

(6) 可用抗-PARP 抗体对细胞裂解产物进行蛋白质印迹来验证细胞凋亡的成功诱导［见 3.2.2～3.2.5 和注意事项 (7)］，也可用抗-M30 细胞死亡抗体进行免疫荧光来分析（见 3.4.5 和图 20.1）。

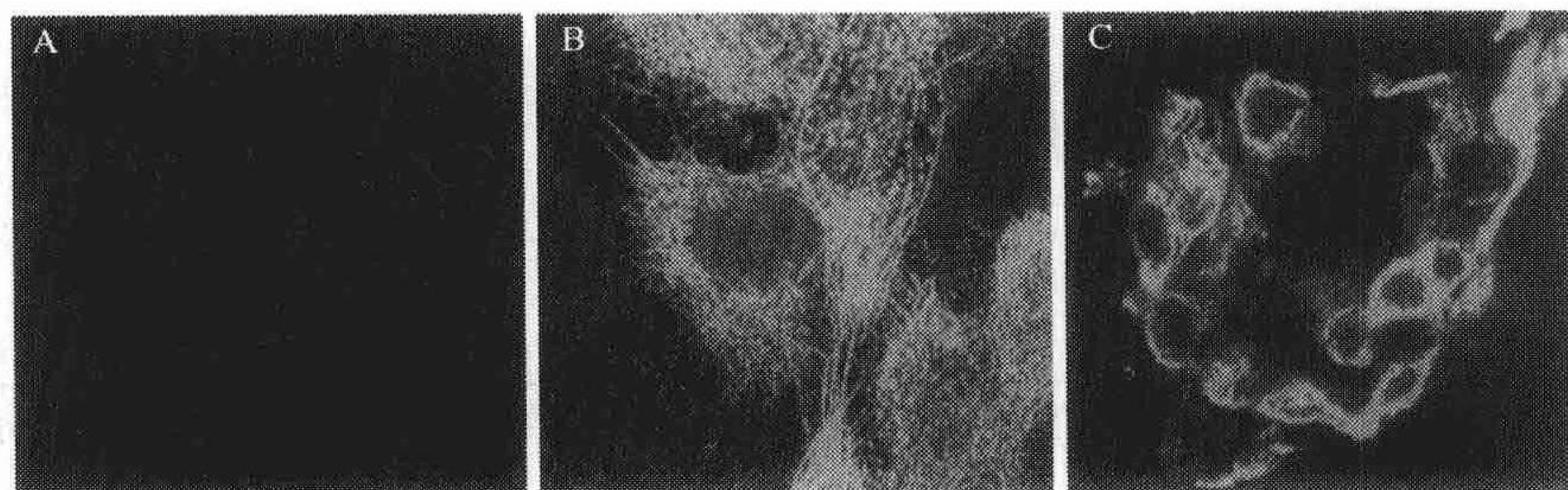


图 20.1 用抗-M30 细胞死亡抗体检测凋亡 HaCaT 角蛋白 18 的裂解片段

在共聚焦图像上，用十字孢碱诱导凋亡 0 h (A) 时没有染色，而在诱导凋亡 3 h (B) 和 6 h (C) 后，角蛋白 18 裂解片段显著增加同时伴有细胞形态学改变。

3.2.2 溶解桥粒蛋白

(1) 在诱导凋亡后不同的时间段收集细胞（如 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h），分析桥粒蛋白的凋亡裂解动力学。

(2) 从细胞培养液中收集脱落的细胞，310 *g* 离心 10 min，弃去培养基，−20℃保存。

(3) 用 PBS+轻柔吹洗贴壁细胞两次，加入 150 μl 冰冷的裂解缓冲液，4℃孵育 10 min。

(4) 用细胞刮铲将细胞从培养皿中刮下，并与从细胞培养上清液中收集的细胞沉淀小块混合在一起。离心（20 800 *g*，10 min，4℃）弃去上清液（细胞裂解产物），−20℃保存。

(5) 在裂解缓冲液的混合细胞中加入将等体积的 8 mol/L 尿素以溶解桥斑蛋白 1 和桥斑蛋白 2，4℃ 等速旋转混匀，孵育 24 h。离心（20 800 *g*，10 min，4℃）弃去未溶解的物质，收集上清液，用于蛋白质印迹分析。

(6) 按厂商的操作说明用 BCA 蛋白测定法检测裂解物的蛋白质浓度。

(7) 加入与裂解产物等量的 4×SDS 样本缓冲液。

(8) 加热至 96℃，5 min，并以 20 800 *g* 旋转 2 min。

(9) 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶（80 mm×85 mm×1.5 mm）的每个加样孔中加入 50 μg 样本。用已预染的分子质量标记作为参照。

3.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法

(1) 根据厂商的操作手册安装玻璃板，间隔为 1.5 mm。

（2）根据表 20.1 制备所需的分离胶溶液，最后加入 TEMED 以启动聚合［见注意事项（8）］。立刻将分离胶溶液灌注在模具中，留下约 25 mm 供浓缩胶用。

表 20.1　分离胶的组成

蛋白质	桥粒斑非素蛋白-1		
	桥斑蛋白	桥黏素	桥粒芯糖蛋白-3
分离胶百分比	5%	7.5%	10%
1.5 mol/L Tris-HCl，pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
H_2O	5.63 ml	4.8 ml	3.97 ml
Rotiphorese®胶 30	1.67 ml	2.5 ml	3.33 ml
10%（*m/V*）SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
10%（*m/V*）APS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMOL/LED	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml

注：所给数据是一块微型胶的量（间隔 1.5 mm）。推荐不同比例的胶用于分析不同的桥粒蛋白和它们的裂解片段。

（3）用异丙醇覆盖分离胶表面。小心操作，不要使异丙醇和分离胶溶液混合。

（4）静置 30 min，让胶聚合。

（5）弃去异丙醇，已聚合分离胶的顶部用去离子水清洗几次，以便完全去除异丙醇。用纸巾吸去残余水分。

表 20.2　浓缩胶的组成

浓缩胶百分比	4.5%
0.5 mol/L Tris-HCl，pH 6.8	0.83 ml
水	1.93 ml
Rotiphorese®胶 30	0.5 ml
10%（*m/V*）SDS	0.034 ml
10%（*m/V*）APS	0.034 ml
TEMOL/LED	0.005 ml

注：所给数据是一块微型胶的量（间隔 1.5 mm）。

（6）按表 20.2 制备浓缩胶溶液。加入 TEMED 以启动聚合。

（7）立即将浓缩胶溶液注入模具，并插入 1.5 mm 的梳子。避免带入气泡。

（8）静置 30 min，让浓缩胶聚合。

（9）取出梳子，立即用去离子水清洗加样孔，洗去未聚合的丙烯酰胺。

（10）将凝胶连同玻璃板一起安装入电泳槽，加入电泳缓冲液。排除在凝胶底部玻璃板之间的气泡。

（11）每个加样孔中加入 30 μl（50 μg）样品。

（12）起始电流为恒流 10 mA/块胶。当样本在浓缩胶中集中后，增大电流到 20 mA/块胶。当溴酚蓝前沿到达凝胶底部时，停止电泳。

（13）从玻璃板中取出凝胶，按 3.2.4 所示准备免疫印迹。

3.2.4　电印迹

此处我们叙述的是通过半干法将蛋白质转移至 PVDF 膜上（0.45 μm 孔径）［见注意事项（9）］。

（1）用甲醇浸泡 PVDF 膜至少 2 min，再用阳极缓冲液 2 孵化至少 5 min。

（2）用阳极缓冲液 1 浸泡 1 张 3MM Whatman 滤纸，第二张滤纸浸泡在阳极缓冲液 2 中，然后取三张滤纸浸泡在阴极缓冲液中至少 1 min。

（3）按图 20.2 安装印迹装置。避免形成气泡！［见注意事项（10）。］

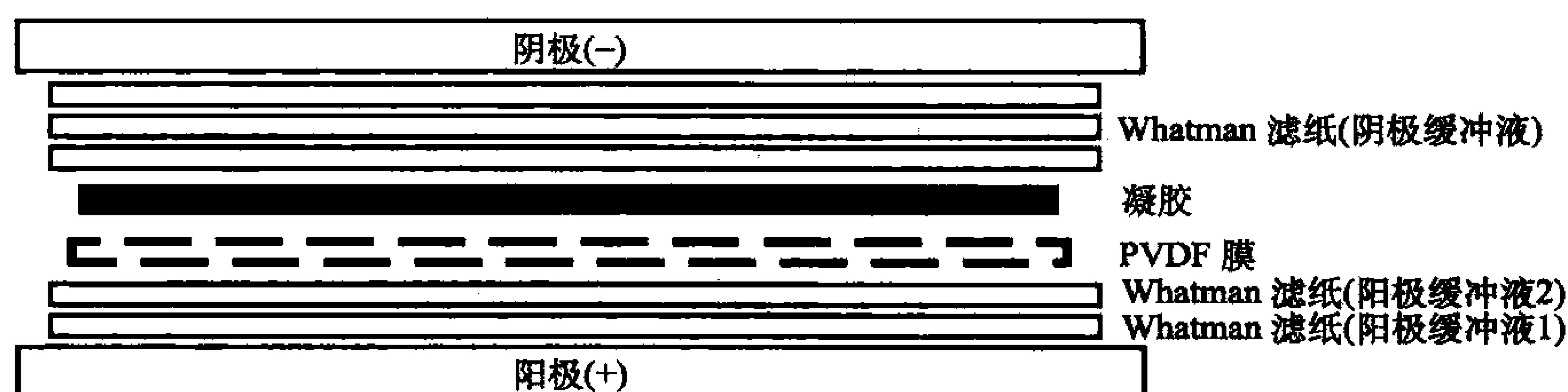


图 20.2 半干蛋白质转印的多层示意图

(4) 以恒流 4.5 mA/cm^2 开始电转印，表 20.3 给出了不同桥粒蛋白的转移时间。

(5) 停止电转印，用 TST 缓冲液洗膜。

表 20.3 桥粒蛋白转膜时间

蛋白质	时间/min
桥粒芯糖蛋白-3	30
桥黏素	25
桥斑蛋白	45
桥粒斑菲素蛋白-1	20

3.2.5 免疫检测

所有实验步骤均在室温下进行。

(1) 用 TST 缓冲液封闭 PVDF 膜 1 h。

(2) 将 PVDF 膜放入稀释好的一抗溶液中（表 20.4），摇床上轻柔摇动孵育 1 h。

表 20.4 抗体用 TST 缓冲液稀释的稀释度

抗体	稀释度
抗桥粒芯糖蛋白-3，胞内区（clone 62）	0.25 μg/ml
抗桥粒芯糖蛋白-3，胞外区（clone 5H10）	1∶200
抗桥黏素（clone Dsc3-U114）	1∶200
抗桥斑蛋白 1 和 2（clone 2.15）	0.2 μg/ml
抗桥粒斑菲素蛋白-1（clone 670）	1∶5000

(3) 弃去抗体溶液，用 10～20 ml TST 缓冲液清洗膜三次，每次 5 min [见注意事项（11）]。

(4) 将过氧化物酶标记的二抗用 TST 缓冲液做 1∶10 000 稀释，将 PVDF 膜在稀释好的二抗溶液中孵育 30 min。

(5) 按步骤（3），清洗膜三次。

(6) 用化学发光法检测，用一干净的玻璃吸管在 PVDF 膜上滚动，以清除多余的缓冲液，将膜在 2 ml Lumi-Light 蛋白质印迹底物中孵育 2 min。用上面的方法去除多余的液体，用塑料膜包裹 PVDF 膜。

(7) 将膜暴露于 X 射线胶片下 1～10 min 就可检测出蛋白质信号，时间的长短有赖于信号的强度。

3.3 免疫沉淀

这部分描述用免疫沉淀的方法来分析脱落的桥粒芯糖蛋白-3 膜外区片段。

(1) 在诱导凋亡后不同的时间点收集细胞培养上清液（如 0、3 h、6 h、9 h、12 h

和 24 h）20 800 g，4℃离心 10 min。

（2）上清液的预清除是将 1 ml 上清液与 30 μl 蛋白 A 琼脂糖填料［按 1∶1 配制于含 0.2%（m/V）牛血清白蛋白的 CSK 缓冲液中］进行预先孵育，其条件是在 4℃不停搅拌 30 min。

（3）20 800 g，4℃离心 10 min，以弃去蛋白 A 琼脂糖颗粒和不溶物。

（4）向细胞培养上清液中加入 40 μl 抗桥粒芯糖蛋白-3（5H10）抗体，4℃持续搅拌孵育 30 min。

（5）加入 40 μl 1∶1 蛋白 A 琼脂糖填料再孵育 1 h。

（6）4℃，2700 g 离心 1 min，沉淀蛋白 A 琼脂糖颗粒，并用 CSK 缓冲液冲洗 5 次。

（7）用 20 μl 2×SDS 样本缓冲液洗脱免疫复合物。煮沸样本 5 min，20 800 g 离心 2 min。

（8）将样本在 7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶（间隔片厚度 0.75 mm）上进行电泳，并按照 3.2.3～3.2.5 所述的方法进行蛋白质印迹分析。

3.4 免疫荧光

这部分描述利用间接免疫荧光法检测和定位凋亡细胞中的桥粒蛋白及其片段，以及角蛋白片段。

3.4.1 在盖玻片上接种细胞

（1）将无菌的盖玻片放入 6 孔培养板中。

（2）加入 2 ml 无菌的 0.1%（m/V）明胶溶液覆盖盖玻片。

（3）室温下孵育 20 min。

（4）尽量弃去明胶溶液并用 3 ml PBS+清洗盖玻片两次。

（5）按 3.1.2 所述的方法从铺满细胞层制备单细胞悬液，以每孔（0.5～1）$\times 10^6$ 个细胞的密度接种于明胶包被的盖玻片上。

（6）培养细胞 18 h。

（7）加入 1 μmol/L 十字孢碱诱导凋亡。

（8）6 h 后，弃去培养基，用 PBS+（提前预热到 37℃）清洗两次。在吸去缓冲液的同时，应避免直接接触到细胞，因为细胞处于松散的贴附状态。

因为本染色流程是针对每一个单个的桥粒蛋白，因而具有明显但很重要的差别，特别是固定的操作，这将在各自的章节中述及（注意事项：凋亡细胞仅仅是松散地贴附在载玻片上，因此在加入和吸去缓冲液或抗体溶液的时候应特别小心，以避免细胞脱落）。固定、清洗和染色的所有步骤均在 Multiwell™ 6 孔细胞培养板中进行。

3.4.2 桥粒芯糖蛋白-3 胞内区的免疫荧光染色

（1）在冰浴条件下将细胞在 0.5%（V/V）Triton X-100 中孵育 20 min 进行通透化处理。

（2）用 3 ml PBS+轻柔洗涤两次。细心操作，避免细胞脱落。

(3) 在室温下，3.7%（m/V）多聚甲醛溶液中固定 20 min。

(4) 弃去多聚甲醛，用 PBS+轻柔洗涤两次。

(5) 为封闭剩余的多聚甲醛，在 PBS+/甘氨酸溶液中孵育 5 min，然后用 PBS+洗涤两次。

(6) 为阻断非特异性结合，在封闭液中室温孵育 30 min。

(7) 用封闭液将抗桥粒芯糖蛋白-3（clone 62）抗体稀释为 1 μg/ml [见注意事项(12)]。

(8) 加 200 μl 一抗溶液至盖玻片上，室温孵育 30 min [见注意事项（13)]。

(9) 弃去一抗，用 3 ml 封闭液轻柔洗涤三次。

(10) 用封闭液将 Alexa 荧光素 488™标记的山羊抗鼠 IgG（二抗）稀释为 1∶500 [见注意事项（12)]。

(11) 加入 200 μl 二抗室温孵育 30 min。

以下步骤均应在黑暗处进行。

(12) 弃去抗体，用封闭液轻柔洗涤三次。

(13) 小心地用 Kimwipes 纸巾沿盖玻片一边吸走多余水分。风干盖玻片 1 min，但应避免完全干燥。

(14) 吸 35 μl Pro Taqs 封固荧光素于一干净的载玻片上。

(15) 将盖玻片轻柔地反转盖在封固剂上，先将盖玻片的一边浸在封固液中，然后慢慢地放下盖玻片，以防气泡形成。

(16) 在黑暗处室温晾干 2 h。

(17) 在免疫荧光显微镜下分析染色成功的细胞。最终应在共聚焦显微镜下分析结果。

3.4.3 桥粒芯糖蛋白-3 胞外区和细胞角蛋白的双重染色

(1) −20℃条件下，细胞在冷甲醇（−20℃预冷）溶液中固定 10 min。

(2) 弃去甲醇，用 PBS+洗涤三次。注意不要使细胞脱落。

(3) 室温封闭 30 min。

(4) 用封闭液将抗桥粒芯糖蛋白-3（clone 5H10）抗体稀释成 1∶100 [见注意事项(12)]。

(5) 加 200 μl 一抗溶液覆盖细胞，室温孵育 30 min [见注意事项（13)]。

(6) 弃去抗桥粒芯糖蛋白-3 抗体，用 3 ml 封闭液洗涤三次。

(7) 用封闭液将抗全细胞角蛋白抗体稀释至 1∶100，加 200 μl 在盖玻片上 [见注意事项（12)]。

(8) 室温孵育 30 min。

(9) 弃去抗全细胞角蛋白抗体，用封闭液洗涤三次。

(10) 用封闭液将 Alexa 荧光素 488™山羊抗鼠 IgG 和 Alexa 荧光素 594™山羊抗兔 IgG 稀释成 1∶500 [见注意事项（12)]。

(11) 加 200 μl 二抗混合液，室温孵育 30 min。

以下步骤均应在黑暗处进行。

（12）弃去抗体，用封闭液轻柔洗涤三次。

（13）用 Kiwipes 纸巾从盖玻片一边轻柔吸走多余水分。风干 1 min，但避免完全干燥。

（14）滴加 35 μl Pro Taqs 封固荧光素在一干净载玻片上。

（15）将盖玻片轻柔地反转盖在封固剂上，应先将盖玻片的一边浸在封固液中，然后慢慢地放下盖玻片，以防气泡形成。

（16）黑暗处室温风干 2 h。

（17）免疫荧光显微镜分析成功染色的细胞。最终应在共聚焦显微镜下分析结果（图 20.3）。

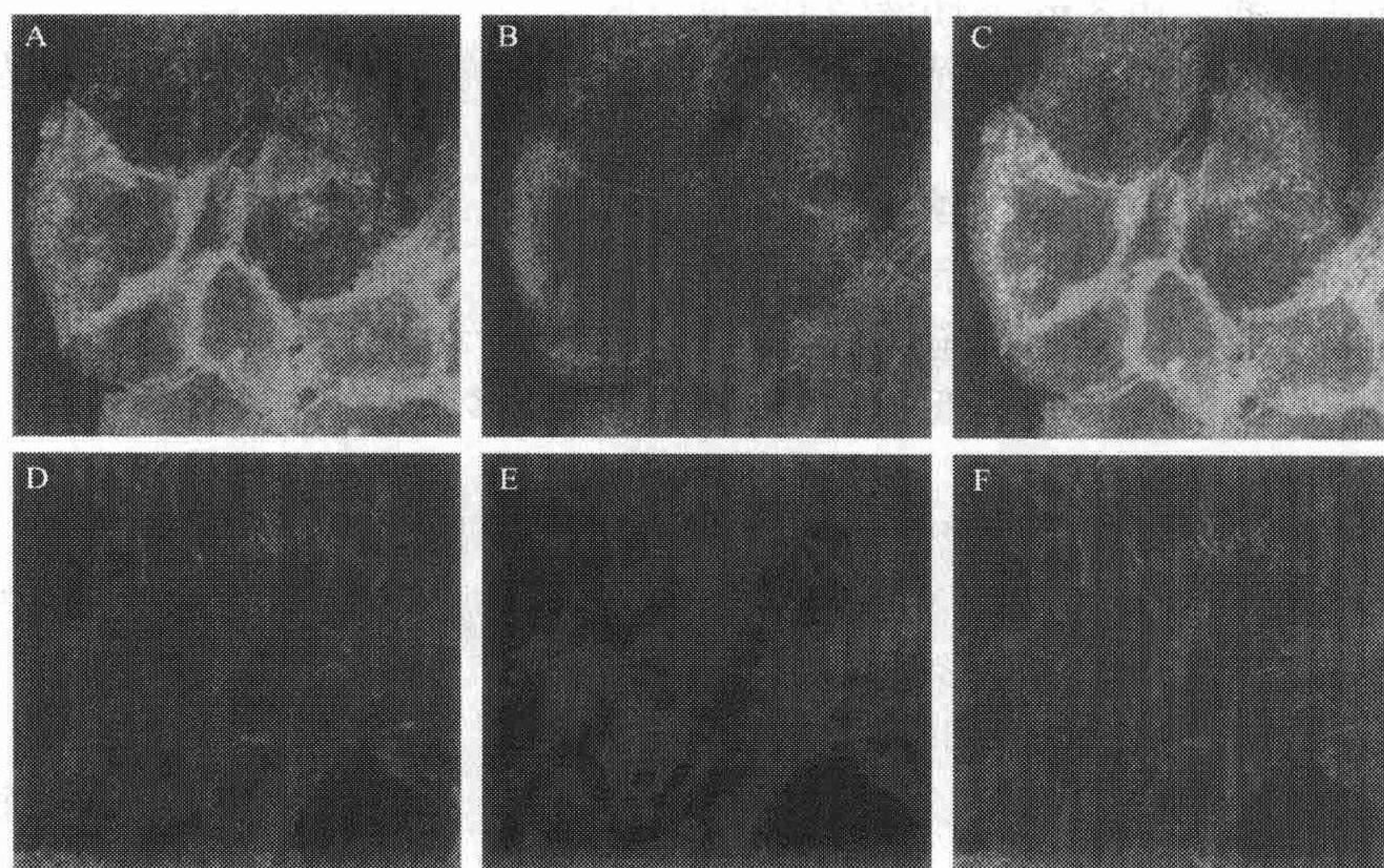


图 20.3　HaCaT 细胞的双重染色免疫荧光显微照片

A、D. 用抗桥粒芯糖蛋白-3 抗体（clone 5H10）染色；B、E. 用抗细胞角蛋白抗体染色；C、F. 显示合并的图像。A～C 表示十字孢碱诱导凋亡后 0 h 的细胞，D～F 显示诱导凋亡后 6 h 的细胞。（见文后彩图）

3.4.4　桥斑蛋白染色

（1）－20℃条件下，在预冷的甲醇中固定细胞 10 min。

（2）用 3 ml PBS＋轻柔洗涤两次。注意不要使细胞脱落。

（3）用封闭液室温封闭非特异性结合 30 min。

（4）用封闭液将抗桥斑蛋白 1 和 2 抗体稀释为 1 μg/ml [见注意事项（12）]。

（5）加 200 μl 一抗溶液，室温孵育 30 min [见注意事项（13）]。

（6）弃去一抗溶液，用 3 ml 封闭液洗涤三次。

（7）用封闭液将 Alexa 荧光素 488™山羊抗鼠 IgG 稀释成 1∶500 [见注意事项（12）]。

（8）加 200 μl 二抗，室温孵育 30 min。

以下步骤均应在黑暗处进行。

（9）弃去抗体，用封闭液轻柔洗涤三次。

（10）用 Kimwipes 纸巾从盖玻片一边轻柔吸走多余水分。风干 1 min，但避免完全

干燥。

(11) 滴加 35 μl Pro Taqs 荧光封固剂在一干净载玻片上。

(12) 将盖玻片轻柔地反转盖在封固剂上，应先将盖玻片的一边浸在封固液中，然后慢慢地放下盖玻片，以防气泡形成。

(13) 黑暗处室温风干 2 h。

(14) 免疫荧光显微镜分析染色成功的细胞。最终应在共聚焦显微镜下分析结果。

3.4.5 桥粒斑菲素蛋白-1 染色

(1) 在冰浴条件下将细胞在 0.5% (*V/V*) Triton X-100 中孵育 20 min 进行通透化处理。

(2) 用 3 ml PBS+轻柔洗涤两次。

(3) 在室温下，3.7% (*m/V*) 的多聚甲醛溶液中固定 20 min。

(4) 吸去多聚甲醛，PBS+清洗两次。

(5) PBS+/甘氨酸溶液中孵育 5 min，然后用 PBS+洗涤两次。

(6) 室温下，封闭液孵育 30 min，封闭非特异性结合。

(7) 用封闭液将抗桥粒斑菲素蛋白-1 (670) 抗体稀释为 1∶250 [见注意事项 (12)]。

(8) 在盖玻片上滴加 200 μl 一抗溶液，室温孵育 30 min [见注意事项 (13)]。

(9) 弃去一抗溶液，用 3 ml 封闭液洗涤三次。

(10) 用封闭液将 Alexa 荧光素 594™ 山羊抗兔 IgG 稀释为 1∶500 [见注意事项 (12)]。

(11) 加 200 μl 荧光素 594 偶联的二抗，室温孵育 30 min。

以下步骤均应在黑暗处进行。

(12) 弃去抗体，用封闭液轻柔洗涤三次。

(13) 用 Kimwipes 纸巾从盖玻片一边轻柔吸走多余水分。风干 1 min，但避免完全干燥。

(14) 滴加 35 μl Pro Taqs 封固荧光素在一干净载玻片上。

(15) 将盖玻片轻柔地反转盖在封固剂上，应先将盖玻片的一边浸在封固液中，然后慢慢地放下盖玻片，以防气泡形成。

(16) 在黑暗处室温风干 2 h。

(17) 免疫荧光显微镜分析染色成功的细胞。最终应在共聚焦显微镜下分析结果。

3.4.6 M30 细胞-死亡染色

(1) −20℃ 条件下，在预冷的甲醇中固定细胞 10 min。

(2) 用 3 ml PBS+轻柔洗涤两次。注意不要使细胞脱落。

(3) 用封闭液室温封闭非特异性结合 30 min。

(4) 用封闭液将抗 M30 细胞-死亡抗体稀释成 1∶100 [见注意事项 (12)]。

(5) 加 200 μl 一抗溶液，室温孵育 30 min [见注意事项 (13)]。

(6) 弃去一抗溶液，用 3 ml 封闭液洗涤三次。

(7) 用封闭液将 Alexa 荧光素 488™山羊抗鼠 IgG 稀释成 1∶500 [见注意事项(12)]。

(8) 加 200 μl 二抗溶液，室温孵育 30 min。

以下步骤均应在黑暗处进行。

(9) 弃去抗体，用封闭液轻柔洗涤三次。

(10) 用 Kimwipes 纸巾从盖玻片一边轻柔吸走多余水分。风干 1 min，但避免完全干燥。

(11) 滴加 35 μl Pro Taqs 封固荧光素在一干净载玻片上。

(12) 将盖玻片轻柔地反转盖在封固剂上，应先将盖玻片的一边浸在封固液中，然后慢慢地放下盖玻片，以防气泡形成。

(13) 在黑暗处室温风干 2 h。

(14) 免疫荧光显微镜分析染色成功的细胞。最终应在共聚焦显微镜下分析结果。

3.5 半胱天冬酶体外酶解桥粒芯糖蛋白-3

这部分实验是体外鉴定半胱天冬酶在底物蛋白上的酶切位点。底物蛋白或底物蛋白的结构域是利用重组蛋白表达技术获取的。为了便于纯化，推荐以融合蛋白的形式表达底物蛋白[12]。

3.5.1 GST-$Dsg3_{cyto}$的重组表达及纯化

3.5.1.1 GST-$Dsg3_{cyto}$的表达

(1) 将一已转化 pGEX4T1-$Dsg3_{cyto}$的细菌克隆，接种于 50 ml LB-氨苄青霉素培养基上，37℃摇床孵育过夜 [见注意事项 (14)]。

(2) 在 2 L Erlenmayer 烧瓶中，将 10 ml 孵育过夜的细菌培养物加入到含有 1% (*m*/*V*) 葡萄糖的 300 ml LB/氨苄青霉素培养基中，30℃摇床 (180 r/min) 孵育过夜，直至 OD_{578}达 0.5～0.7。

(3) 加入 1 mmol/L IPTG，诱导 GST-$Dsg3_{cyto}$表达。

(4) 1 h 后，收集细菌，6000 *g*，4℃离心 10 min，弃去上清液。

以下步骤均在 4℃条件下进行。

(5) 用 20 ml 冷 PBS+清洗细菌，以 6000 *g*，4℃离心 10 min。弃去上清液，倒置离心管将残余液体倒净。

(6) 用 5 ml 冷裂解液重悬细菌。

(7) 将混悬液转移至在冰浴中的 50 ml 离心管内，超声处理，使细菌裂解。超声处理 5 次，每次 20 s，输出控制为 6，40%恒定工作循环 (暂载率)。避免过热，每两脉冲间应有 30 s 间隔。

(8) 显微镜下观察细菌直至完全裂解。

(9) 溶解物以 20 000 *g*，4℃离心 30 min，弃去不溶解的碎屑。

(10) 在冰上将上清液 (细菌裂解产物) 转移至一新的 15 ml 管中。

3.5.1.2 GST-$DSG3_{CYTO}$的纯化

(1) 用 2 ml 1∶1 混合的谷胱甘肽-琼脂糖珠填入 Poly-Prep 层析柱 (8 mm×

40 mm)，用 10 ml 冷 PBS+平衡最终体积为 1 ml 的胶床，避免层析柱干燥。

（2）轻轻向柱内加入细菌裂解物［见 3.5.1.2 的步骤（10）］，不要使胶床重新悬浮，使裂解产物利用重力流过层析柱。

（3）先后用 10 ml 洗涤缓冲液及 20 ml PBS+冲洗层析柱。

（4）用 5 ml 洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白质，按每部分 0.5 ml 收集洗脱液。

（5）用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（10%）（见 3.2.3）和考马斯亮蓝染色凝胶分析各流分。

（6）将含有高浓度蛋白质的流分混合，用 10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0 透析 24 h。更换两次透析缓冲液，以完全洗脱谷胱甘肽。

（7）用液氮快速冷冻蛋白质，−20℃保存。

3.5.2 半胱天冬酶-3 的酶切

（1）用 BCA 蛋白测定法测定 GST-融合蛋白的浓度。

（2）建立酶切反应体系：

105 μl 2×半胱天冬酶裂解缓冲液

+x μl GST-融合蛋白（5～10 μg）

+x μl 重组半胱天冬酶-3（100 ng）

加水定容至 210 μl。

（3）37℃孵育 4～6 h。

（4）加入 70 μl 4×SDS 样本缓冲液，煮沸探针，20 800 g，离心 2 min。

3.5.3 制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和电印迹

（1）根据使用说明书安装玻璃片。凝胶的尺寸大约为 160 mm×140 mm×1.5 mm。

（2）如表 20.5 所示制备 14%丙烯酰胺溶液（不要添加 TEMED）。所有溶液均在用前配制，过滤（0.45 μm）并排除溶液中气体［见注意事项（8）］。

表 20.5 制备胶的组成

	分离胶溶液（14%）	成层胶溶液（4.5%）
7.5 g 丙烯酰胺和 0.2 g 双丙烯酰胺加入 25 ml H_2O	18.4 ml	2.5 ml
1.5 mol/L Tris-HCl，pH 8.8	10 ml	—
0.5 mol/L Tris-HCl，pH 6.8	—	4.2 ml
H_2O	10.8 ml	7.8 ml
10%（m/V）SDS	0.4 ml	0.168 ml
10%（m/V）过硫酸铵	0.4 ml	0.168 ml
四甲基乙二胺	0.01 ml	0.01 ml

（3）聚合前加入 10 μl TEMED，迅速将胶注入模具内。静置至少 4 h 使其聚合。

（4）于凝胶的加样孔中加入 260 μl 裂解产物。以 7 mA/块胶的恒定电流进行电泳（最好过夜）。当溴酚蓝染料的前端到达胶底部时，停止电泳。

（5）用半干法将裂解蛋白转移到 PVDF 膜（0.2 μm 孔径）。

（6）用甲醇浸湿 PVDF 膜 2 min，在 PVDF 缓冲液中孵育 5 min。

（7）安装印迹的多层结构（避免形成气泡）：用阳极缓冲液浸泡过的三张 3MM Whatman 滤纸；PVDF 膜；聚丙烯酰胺凝胶；用阴极缓冲液浸泡过的三张 3MM Whatman 滤纸。

（8）以恒定电流 4.5 mA/cm^2 电转移 1 h。

（9）用考马斯亮蓝染色，检测 PVDF 膜上的裂解产物（见 3.5.4.）。

3.5.4 PVDF 膜表面蛋白的考马斯亮蓝染色法

（1）将 50 mg 考马斯亮蓝 R250 溶解于 250 ml 甲醇中，加 250 ml 水，过滤除去未溶解的染料颗粒，染色液应用前新鲜配制。

（2）将膜浸泡在染色液中，摇床染色 1 h。

（3）将膜浸入含 50%（*V/V*）甲醇+10%（*V/V*）乙酸溶液中直至条带清晰可见。脱色过程中反复更换脱色液。

（4）用水漂洗膜，直至膜上几乎没有背景色，将膜风干。

（5）切取裂解产物的染色条带，−20℃保存。

（6）用 Edman 降解法进行裂解产物的序列测定。

4 注意事项

（1）这部分描述的方法大体上适用于上皮细胞。

（2）用 Nicool LM10 细胞冻存仪冻存细胞操作非常简单，冻存细胞具有非常好的复苏存活率，而且重复率高。当关键的细胞系包括胚胎干细胞或原代细胞（如角质形成细胞）必须冻存的时候，它显得特别重要。至今为止，我们所用的其他冻存规程没有比这种更有效的。如果无法获得这种细胞冻存仪，也可用其他方法替代，例如，用 Nalgene® Cryo 冻存箱（Nalgene；cat. no. 115650）。

（3）胎牛血清加热至 56℃灭活 30 min，4℃保存。

（4）β-巯基乙醇具有恶臭，并且高浓度的 β-巯基乙醇对皮肤和眼睛具有非常大的破坏作用，所以应在化学通风橱内配备 2× 或 4×SDS 样品缓冲液，并戴手套。

（5）多聚甲醛有毒性。配备 3.7%（*m/V*）的多聚甲醛时，应在化学通风橱内进行，并戴合适的手套。

（6）诱导凋亡的另外一种方法，可以用 2 ml 含有 20 μl 肿瘤坏死因子-α 或 0.8 μl 抗 CD 95 抗体的新鲜培养基孵育 48 h。

（7）PARP 是一种参与 DNA 修复的核酶，在 DNA 损伤时被激活。PARP 在凋亡早期被半胱天冬酶酶解，被认为是凋亡的特有标志。PARP 裂解成特异性的 89 kDa 和 24 kDa 片段，并可用抗体检测出来。为了用蛋白质印迹法分析细胞裂解产物，可将全部蛋白质裂解物在 7.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行分离，再用半干印迹法（20 min）将蛋白质转移到膜上。为了免疫检测，用 TST 缓冲液将抗 PARP 抗体稀释为 1∶1000。

（8）丙烯酰胺具有很强的神经毒性并可被皮肤吸收（具有累积效应），所以操作时需小心并戴手套。

(9) 蛋白质转移也可以用印迹池（槽）进行。硝酸纤维素膜可替代 PVDF 膜。然而硝酸纤维素膜极易被撕坏。

(10) 在叠放转印三明治结构时，各层之间可能会有气泡。可以用吸管或 15 ml 试管在三明治上轻轻地滚动，赶走气泡。

(11) 大多数的抗体可以被重复利用 3～5 次。

(12) 为了除去抗体溶液中的不溶物或沉淀物，建议在使用前进行高速离心（20 800 *g*，1 min）。

(13) 为了减少染色所需的抗体量，可吸取 100 μl 抗体溶液滴加在石蜡膜上，再将盖玻片倒置在液体滴上。为了避免干燥，可以在石蜡膜的边角上滴几滴水，并盖上盖子，以制造一个湿润环境。但要避免水和抗体溶液混合。

(14) 用新鲜转化的细菌可获得最高的表达率。

致　谢：感谢 Torsten Schöneberg 在共聚焦免疫荧光显微镜技术上的帮助。感谢 Deutsche Forschungsgemeinschaft，the VW-Foundation and the Sonnenfeld-Foundation 提供资金。

（吕雅洁 译　高天文 校）

参考文献

[1] Krammer，P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**，789—795.

[2] Ferri，K. F. and Kroemer，G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* **3**，E-255—E-263.

[3] Meier，P.，Finch，A.，and Evan，G. (2000) Apoptosis in development. *Nature* **407**，796—801.

[4] Hathaway，T. R. and Kuechle，M. K. (2002) Apoptosis and cutaneous biology. *Adv. Dermatol.* **18**，287—311.

[5] Earnshaw，W. C.，Martins，L. M.，and Kaufmann，S. H. (1999) Mammalian caspases: structure，activation，substrates，and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**，383—424.

[6] Steinhusen，U.，Weiske，J.，Badock，V.，Tauber，R.，Bommert，K.，and Huber，O. (2001) Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**，4972—4980.

[7] Weiske，J.，Schoeneberg，T.，Schroeder，W.，Hatzfeld，M.，Tauber，R.，and Huber，O. (2001) The fate of desmosomal proteins in apototic cells. *J. Biol. Chem.* **276**，41 175—41 181.

[8] Garrod，D. R.，Merritt，A. J.，and Nie，Z. (2002) Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**，537—545.

[9] Garrod，D. R.，Merritt，A. J.，and Nie，Z. (2002) Desmosomal adhesion: structural basis，molecular mechanism and regulation. *Mol. Membr. Biol.* **19**，81—94.

[10] Green，K. J. and Gaudry，C. A. (2000) Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**，208—216.

[11] Huber，O. (2003) Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell Mol. Life Sci.* **60**，1872—1890.

[12] Huber，O. and Huber-Wunderlich，M. (2000) Recombinant proteins，in *Journal of chromatography library* **61**，*Protein liquid chromatography* (Kastner，M.，ed.)，Elsevier Science B. V.，Amsterdam，The Netherlands，pp. 557—586.

第 21 章　角质形成细胞表达间隙连接蛋白 43 的流式细胞术分析

Maja Matic, Christopher Pullis, Marc G. Golightly, Sanford R. Simon

摘　要：原代角质形成细胞的单细胞悬液由非均质的细胞群组成，包括基底细胞（干细胞、短暂扩增细胞和有丝分裂后基底细胞）及处于不同分化阶段的基底层上细胞。采用流式细胞术可以对单个细胞上抗原表位的差异表达进行定量分析。本章描述了在分离、固定、通透和荧光免疫标记角质形成细胞后，使用流式细胞术同时分析角蛋白 14（K14）及间隙连接蛋白 43（Cx43）这两种细胞内抗原的表位，并把细胞区分成三种亚群：干细胞（角蛋白 14 表达阳性、间隙连接蛋白 43 表达阴性的基底细胞）、基底层上细胞（间隙连接蛋白 43 表达阳性、角蛋白 14 表达阴性的细胞）及表达间隙连接蛋白 43 且角蛋白 14 阳性的基底细胞。角质形成细胞的最后一个亚群包括了短暂扩增细胞和有丝分裂后基底细胞。本章还描述了每一细胞亚群的光散射特征。

关键词：表皮；角质形成细胞；干细胞；间隙连接；间隙连接蛋白；荧光激活的细胞分选；免疫细胞化学

1　导言

表皮的上皮细胞由间隙连接或间隙连接蛋白分子所构成的细胞间水通道簇偶联在一起。间隙连接蛋白由一个多基因家族所编码[1~3]。现已报道，人的表皮可以表达 10 种间隙连接蛋白[4,5]，其中一些间隙连接蛋白基因的突变已证明与人类皮肤疾病相关联[6]。最近的研究表明，缺乏间隙连接蛋白 43（Cx43）表达的角质形成细胞表现出很多属于干细胞的特性，包括在基底层内的相对细胞数目、细胞大小和颗粒性等[7,8]。

在这一章里，我们将叙述新生儿包皮角质形成细胞的分离（见 3.1 和 3.2）；角质形成细胞的固定和通透（见 3.3）；以及使用抗 Cx43 和 K14 抗体的免疫细胞化学（见 3.4）。在 3.5 中概括了间接荧光双色标记技术分析角质形成细胞所需要的流式细胞仪参数设置和实验对照。最后，在 3.6 中描述了对 K14 与 Cx43 表达不同的细胞群进行相对大小和颗粒性分析所采用的设门策略。

在 20 世纪 70 年代早期，流式细胞仪最初是用来进行血细胞计数的。现在，这种非常精密的仪器由于使用三种或更多的激光光源和多个荧光检测器，其应用范围得到扩展，已具备超越大多数临床和研究需要的能力。所以，这些进展已能非常精细地分析细胞表面和细胞内的物理特性及抗原特性，例如，细胞的相对大小和颗粒性（复杂性），以及通过测定所用探针的荧光强度对细胞表面及细胞内的多种抗原进行定量。更精密的流式细胞仪（荧光激活的细胞分选器）还能通过前面所列出的单一或多个参数，对非均

质的细胞群进行分离和纯化。

在中心仪器室，通常不对表皮细胞进行分析。为了有助于相关资料的采集和分析，下面描述了用流式细胞术分析角质形成细胞的操作方法。

2 材料

2.1 仪器设备

(1) 流式细胞仪：FACScan (Becton DickinsonMountainview，CA)。

(2) 细胞分析软件 (Cell Quest software，BD Biosciences)。

(3) 倒置光学显微镜 (Nikon)。

(4) 微型离心机，4℃ (Marathon Micro H，Fisher Scientific，Pittsburgh，PA)。

(5) 37℃孵箱。

(6) 振荡器 (微量滴定板振荡器，Lab-line instruments，Melrose Park，IL)，或类似设备。

(7) 剪刀和镊子 (高压灭菌) (Fisher Scientific，Pittsburgh，PA)。

(8) 1.5 ml 微量离心管 (EP 管) (USA Scientific，Ocala，FL；cat. no. 1615-5500)。

(9) 15 ml 聚丙烯锥形底离心管 (Falcon Blue Max，Beckton Dickinson，Franklin Lakes，NJ；cat. no. 352096)。

(10) 一次性无菌巴斯德吸管。

(11) 100 mm ×20 mm 和 60 mm×15 mm 一次性圆底无菌塑料培养皿 (Beckton Dickinson，cat. no. 353003，353004)。

(12) 无菌的 35 μm 过滤管 (Beckton Dickinson，cat. no. 2235)。

(13) 0.22 μm 滤器 (Millipore，Bedford，MA；cat. no. 5CGPU01RE)。

(14) 血细胞计数器。

2.2 角质形成细胞分离

(1) 中性蛋白酶 II (Boeringer Mannheim，Indianapolis，IN；cat. no. 165859)。

(2) 达尔伯克氏必需基本培养基 (DMEM) (Gibco，Grand Island，NY；cat. no. 11995)。

(3) 磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS；Hyclone，Logan；cat. no. SH30028.02)。

(4) 胎牛血清 (Hyclone，cat. no. SH30070.03)。

(5) 青霉素 G (Sigma，St. louis，MO；cat. no. p-3032)。

(6) 硫酸链霉素 (Sigma，cat. no. S-6501)。

(7) 胰蛋白酶 (ICN Biomedicals，Irvine，CA；cat. no. I03140)。

(8) 乙二胺四乙酸 (EDTA；Boeringer Mannheim，Indianopolis，IN；cat. no. 808270)。

(9) Ham F12 培养基 (Gibco，cat. no. 11765)。

2.3 免疫细胞化学

（1）牛血清白蛋白（BSA；Sigma，cat. no. A-3059）。

（2）组织固定液（HistoChoice；Amresco，Solon，OH；cat. no. H120）。

（3）聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）（Sigma，cat. no. T-9284）。

（4）抗间隙连接蛋白 43 的小鼠单克隆抗体（Chemicon，Temecula，CA；cat. no. MAB3068），IgG1 同种型，分装后－20℃保存。

（5）抗角蛋白-14 的小鼠单克隆抗体（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. C8791），IgM 同种型，分装后－70℃保存。

（6）别藻蓝蛋白（APC）标记的大鼠抗小鼠 IgG1 单克隆抗体（BD Biosciences，cat. no. 550874），4℃避光保存。

（7）荧光素（FITC）结合的山羊抗小鼠 IgM 抗体（Sigma，cat. no. F-9259），4℃避光保存。

2.4 溶液

（1）10× 中性蛋白酶溶液：用 DMEM 配制成 25 mg/ml，无菌过滤。等量分装为 2 ml，可在－20℃保存至少 3 个月。

（2）Triton X-100：0.03%，PBS 配制，保存于 4℃。

（3）EDTA：0.01%，无菌 PBS 配制。

（4）胰蛋白酶：无菌 PBS 配制为 0.05%，等量分装为 2 ml，－20℃保存。

（5）胎牛血清（FBS）：无菌 PBS 配制成 5%（简写为 PBS/FBS）。

（6）DMEM/F12 培养基：3∶1（*V*/*V*），含 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 硫酸链霉素（简写为 DF/PS）。

（7）含 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 硫酸链霉素的 PBS（简写为 PBS/PS）。

（8）牛血清白蛋白（BSA）：5%，PBS 配制。

3 方法

3.1 表皮片的制备

（1）将常规包皮环切术后 2 h 内的新生儿包皮［见注意事项（1）］收集在盛有 2～3 ml DF/PS 的 15 ml 聚丙烯管中，用无菌镊子和剪刀除去皮下脂肪。

（2）在盛有 PBS/PS 的三个圆底平皿中依次浸没清洗组织。

（3）将包皮组织剪成 5 mm×5 mm 大小，放入含 1× 中性蛋白酶的 DF/PS 培养液中，4℃孵育过夜。

（4）用镊子将表皮片与其下的真皮层分离［见注意事项（2）］，然后放入含 EDTA 溶液的 60 mm×15 mm 圆底平皿中。

3.2 单细胞悬液的获得

（1）加入 2 ml 0.05%胰蛋白酶 PBS 溶液，于 37℃振荡器摇动平皿 5～10 min［见

注意事项（3）和（4）]。

（2）用无菌的巴斯德吸管将溶液收集到 15 ml 聚丙烯管中，加入 10%FBS 终止胰蛋白酶的作用。

（3）用含 5%FBS 的 PBS（PBS/FBS）清洗表皮片一次，用试管收集清洗的溶液。

（4）将溶液转移至 EP 管中，于 4℃，410 *g* 离心 4 min [见注意事项（5）]。

（5）细胞计数 [见注意事项（6）]。

3.3 角质形成细胞的固定与通透

（1）每次反应使用 10^6 个细胞 [见注意事项（7）]。

（2）用巴斯德吸管将细胞重悬于 1 ml 组织固定液（HistoChoice）中，室温孵育 30 min [见注意事项（8）和（9）]。

（3）用 PBS/FBS 洗细胞两次。

（4）用 0.03% Triton X-100 于 4℃通透细胞 5 min。

（5）PBS/FBS 液洗细胞三次。

3.4 免疫细胞化学

（1）实验的样本加入抗 Cx43 单克隆抗体（用 PBS 作 1∶300 稀释）和抗 K14 单克隆抗体 IgM（用 PBS 作 1∶200 稀释），室温孵育 1 h [见注意事项（10）]。与每个一抗孵育的样本即为单个阳性对照，二抗对照的样本应在 PBS/FBS 中孵育。

（2）用 PBS/FBS 洗细胞两次。

（3）实验样本和二抗对照分别与别藻蓝蛋白标记的大鼠抗小鼠 IgG1 二抗（稀释度 1∶66）及荧光素结合的山羊抗小鼠 IgM 二抗（稀释度 1∶300）孵育 [见注意事项（10）]。单一阳性对照只与相应二抗孵育。

（4）用 PBS/FBS 洗细胞三次。

3.5 流式细胞术的仪器设置与对照

（1）用 35 μm 过滤管过滤每个样品 [见注意事项（11）]。

（2）设置前向角散射为线性模式 E-1，调节光电倍增管的电压与增益 [见注意事项（12）]。

（3）使用标准的流式细胞设门技术排除细胞碎片，选择细胞进行荧光分析（图 21.1 A）。

（4）每次分析收集至少 10 000 个细胞。

（5）使用二抗对照进行荧光补偿，调节光电倍增管的电压 [见注意事项（13）及图 21.1 B]。

（6）用单一抗体的阳性对照进行荧光补偿 [见注意事项（14）]。

（7）将单一抗体阳性对照的样品混合后上样，调节荧光补偿 [见注意事项（15）及图 21.1 C]。

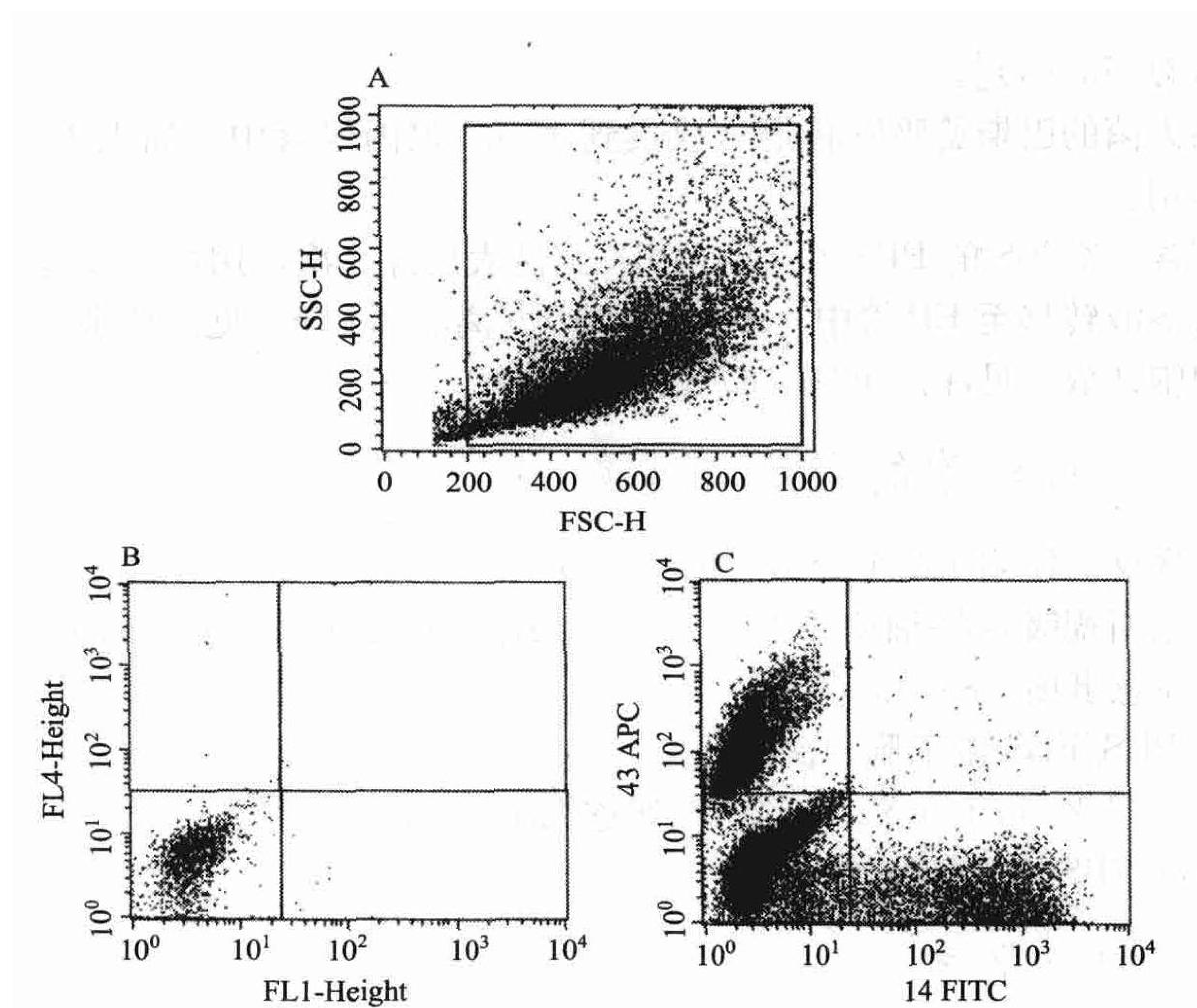


图 21.1　流式细胞术分析

A. 在一线性标尺上以任意单位显示前向角散射（FSC-H）和侧向角散射（SSC-H）的散点图。每一个点代表每一单个细胞的前向角散射值和侧向角散射值。矩形门用来排除细胞碎片，选择细胞进行双色荧光分析。B. 二抗对照组位于左下象限。C. Cx43-APC 和 K14-FITC 的两个单一抗体阳性对照混合后的散点图，左上为 Cx43-APC 阳性，右下为 K14-FITC 阳性，左下为双阴性，右上为双阳性。

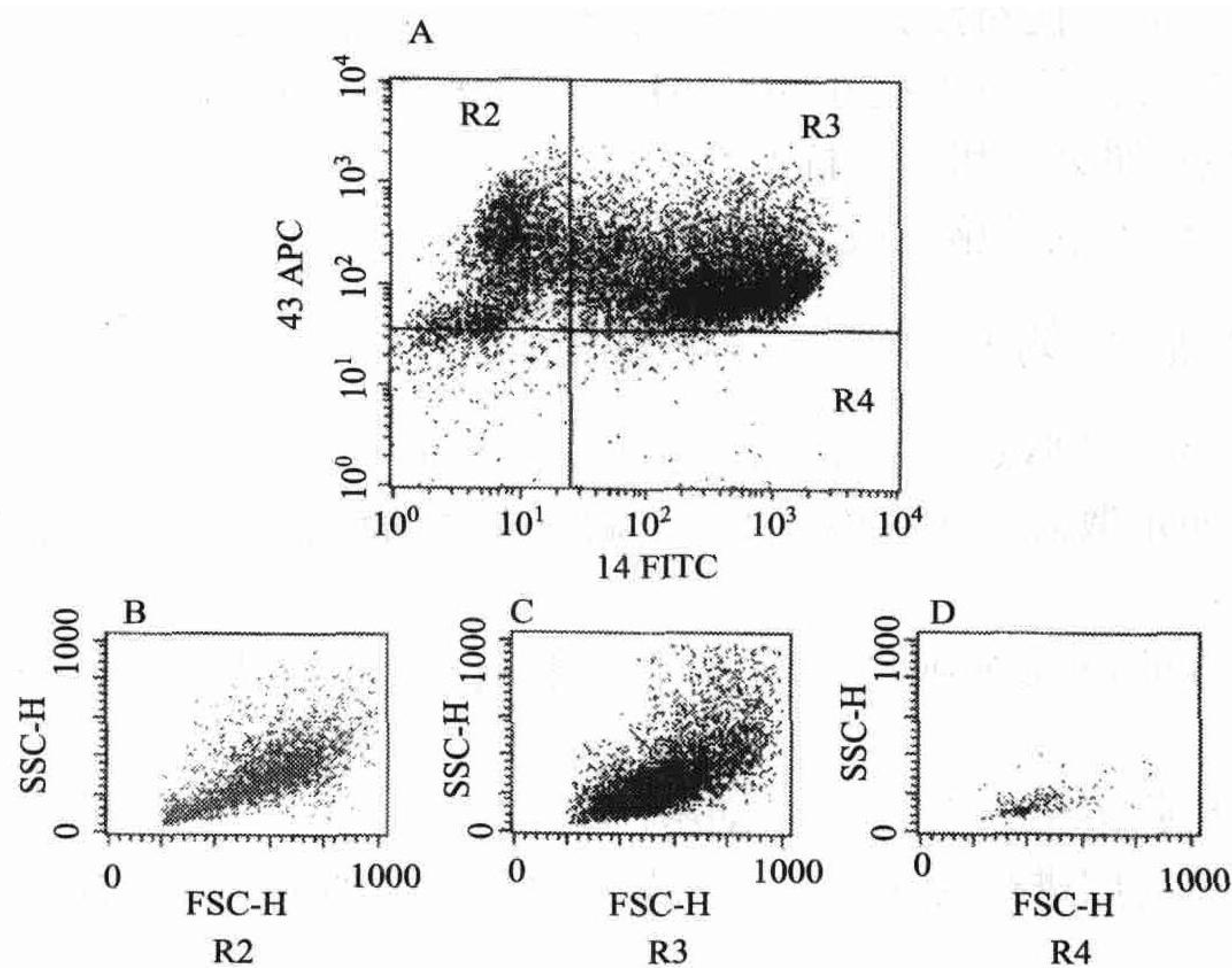


图 21.2　流式细胞术分析

A. 在一对数标尺上以任意单位显示的散点图显示两种抗体所标记角质形成细胞的荧光强度，y 轴代表 APC 标记的抗 Cx43 抗体，x 轴代表 FITC 标记的抗 K14 抗体。这些象限是利用二抗对照与单一抗体阳性对照（图 21.1 B、C）所建立的。基底层上细胞（Cx43 阳性、K14 阴性）位于左上象限，R2。假定的干细胞（Cx43 阴性、K14 阳性）位于右下象限，R4。剩余的基底细胞（Cx43 阳性、K14 阳性）位于右上象限，R3。阴性细胞位于左下象限。B～D 显示前向角和侧向角散射值的散点图，B 为基底层上细胞，C 为排除了假定干细胞的基底细胞，D 为假定的干细胞。

3.6 光散射特性与荧光强度的相关性

（1）俘获样品（图 21.2 A）。

（2）设立与 R2、R3 及 R4 相对应的三个单独门及每一个门的虚拟门［见注意事项（16）和（17）］。

（3）后门 R2、R3 和 R4 见图 21.2 B～D，注意事项（18）与图 21.2 D 有关。

4 注意事项

（1）为了获取具有相同散射模式的角质形成细胞，应尽量收集色泽相近的包皮样本，这是因为不同色素水平的角质形成细胞可能会影响其侧向角散射特征。

（2）从真皮分离出的表皮片应以基底层面将溶液放置在装有 2 ml EDTA（用 PBS 配制 0.01%）的圆底平皿中。由于角质层具有疏水性，表皮片的基底层本身将趋向于面向溶液。当完成所有表皮片的分离并放入 EDTA 溶液中后，再加入预冷的 0.05%胰蛋白酶溶液。

（3）胰蛋白酶消化圆底培养皿所获得的细胞产量较多时，也可使用 15 ml 聚丙烯管。采用 15 ml 聚丙烯管时表皮片容易彼此重叠，导致胰蛋白酶消化所释放的角质形成细胞陷于未消化且黏稠的表皮片之间。

（4）胰蛋白酶消化 5～10 min 主要作用于基底层。延长在胰蛋白酶/EDTA 液中的孵育时间可使更多的角质形成细胞从基底层上释放，但长时间孵育可导致基底层角质形成细胞活力下降。

（5）每次清洗细胞后于 4℃ 410 *g* 离心 4 min 收集细胞。

（6）通常每个包皮样本可获得的细胞数超过 1×10^6 个。

（7）需要三份样品：①二抗对照组（细胞只用二抗孵育）；②Cx43 的单一抗体阳性对照组，③K14 的单一抗体阳性对照组。

（8）组织固定液（HistoChoice）能保持细胞形态并且无毒。

（9）确保这一步骤的操作要迅速而又充分，以防止固定的细胞凝聚成团。

（10）稀释后，加 5%BSA 溶液，于 410 *g* 离心抗体 1 min 以沉淀免疫复合物。

（11）这一步是防止细胞团块堵塞仪器。

（12）选择线性模式 E-1 是因为角质形成细胞的相对体积较大，而线性模式 E00 常用于大多数白细胞的分析。

（13）二抗对照组的荧光强度应位于左下象限（图 21.1 B）。

（14）Cx43-APC 单一抗体阳性对照组的荧光强度应位于左上象限（也可见一阴性细胞群）。K14-FITC 单一抗体阳性对照组的荧光强度应位于右下象限（也可见一阴性细胞群）。

（15）这一混合抗体的样品应出现仅有绿色荧光的细胞群（右下象限）、仅有红色荧光的细胞群（左上象限）和阴性对照细胞群（左下象限）。为了纠正两种荧光光电倍增器之间的任何颜色掺杂，有必要进行适当的荧光补偿。

（16）荧光散点图可分为 4 个象限：Cx43 阴性和 K14 阴性（左下），Cx43 阳性和

K14 阴性（左上），Cx43 阳性和 K14 阳性（右上），Cx43 阴性和 K14 阳性（右下）。

（17）虚拟门或逻辑门是组合的门。本实验中虚拟门用来分析特定象限中细胞的颗粒性，例如，图 21.2 A 中的 R2 是由“象限 R2”门及图 21.1 A 中的象限门这两个门组合而成的。后者必须包括初始分析时被排除在图 21.1A 象限以外的细胞。可通过软件菜单“gate list”进行这些门的设置。

（18）Cx43 阴性、K14 阳性的细胞群除了数目偏少外，细胞体积也相对较小、复杂性较低[7,8]。

致　谢：本项工作得到 USPHS/NIH/NIAMS 基金（no. K01AR02079）对 Maja Matic 的资助。

（赵　云译　彭代智校）

参考文献

[1] Beyer, E. C., Paul, D. L., and Goodenough, D. A. (1990) Connexin family of gap junction proteins. *J. Membr. Biol.* **116**, 187—194.

[2] Wilecke, K., Hennemann, H., Dahl, E., Jungbluth, S., and Heynkes, R. (1991) The diversity of connexin genes encoding gap junction proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **56**, 1—7.

[3] Kumar, N. M. and Gilula, N. B. (1992) Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin. Cell Biol.* **3**, 3—16.

[4] Di, W.-L., Rugg, E. L., Leigh, I. M., and Kelsell, D. P. (2001) Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 958—964.

[5] Salomon, D., Masgrau, E., Vischer, S., Ullrich, S., Dupont, E., Sappino, P., et al. (1994) Topography of mammalian connexins in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 240—247.

[6] Richard, G. (2001) Human connexin disorders of the skin. *Cell Commun. Adhes.* **8**, 401—407.

[7] Matic, M., Evans W. H., Brink, P. R., and Simon, M. (2002) Epidermal stem cells do not communicate through gap junctions. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 110—116.

[8] Matic, M. and Simon, M. (2003) Label retaining cells (presumptive stem cells) of mice vibrissae do not express gap junction protein connexin 43. *J. Invest. Dermatol.*, *Symp. Proc.* **8**, 92—95.

第22章　角质形成细胞培养物内间质金属蛋白酶-9和金属蛋白酶组织抑制剂-1的检测

Takashi Kobayashi

摘　要：间质金属蛋白酶（MMP）和金属蛋白酶组织抑制剂（TIMP）在表皮组织的新陈代谢中发挥重要的作用。其中，角质形成细胞及其特异性抑制剂 TIMP-1 涉及多种病理、生理过程。为了检测条件培养液中来自角质形成细胞的 MMP-9 和 TIMP-1，下面介绍明胶酶谱法、反酶谱法（定性及定量）和使用各个分子特异抗体的蛋白质印迹法。这些方法在阐明皮肤病理生理环境和寻找新药物方面是有用的工具。

关键词：角质形成细胞；间质金属蛋白酶；金属蛋白酶组织抑制剂；酶谱法；蛋白质印迹法

1　导言

角质形成细胞是表皮细胞的主要组成部分。它们位于整个身体的最外层，被认为在维持身体内环境稳定中发挥最基础的作用。间质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMP）和金属蛋白酶组织抑制剂（tissue inhibitors of metalloproteinases，TIPM）在组织新陈代谢中发挥重要但是相反的作用[1,2]。其中，MMP-9 涉及皮肤病学中的多种病理生理过程[3~9]。因此，检测角质形成细胞中 MMP-9 及其抑制剂 TIMP-1 可能是了解皮肤病病理、生理过程的有效工具，而且可以用于监测疾病的模式及寻找新的药物。本章讲述明胶酶谱法和反酶谱法，这两种方法和蛋白质印迹法一起被用来检测从角质形成细胞培养物所得条件培养基内的 MMP-9 和 TIMP-1。

MMP-9 和 MMP-2 都是明胶酶[1,2,10]，使用明胶酶谱法不仅可以对它们进行定性检测，而且可以进行定量检测[11~16]。对应的反酶谱法被发展成了检测 TIMP 的方法[16,17]。这些方法用来评估它们的酶活性和抑制活性。蛋白质印迹法则是检测这些分子抗原特异性的有效方法。

2　材料

除了 30％甲醇和 10％乙酸的脱色液外，所有用于明胶酶谱法和反酶谱法的溶液都要使用双蒸水或者超纯水来配制。

2.1　明胶酶谱法

(1) 2.5％ 明胶［m/V；见注意事项 (1)］。

（2）培养角质形成细胞所得的条件培养基（无血清）[见注意事项（2）和（3）]。

（3）1×分离胶缓冲液 1.5 mol/L Tris-HCl，pH 8.8。

（4）1×浓缩胶缓冲液 0.5 mol/L Tris-HCl，pH 6.8。

（5）30% 丙烯酰胺（m/V）-1% N'，N'-双甲叉丙烯酰胺（m/V）水溶液 [见注意事项（4）]。

（6）10% 十二烷基硫酸钠（SDS）。

（7）N，N，N'，N'-亚甲基双丙烯酰胺（TEMED）。

（8）5% 过硫酸铵（m/V）。

（9）5×上样缓冲液：0.25 mol/L Tris-HCl，pH 7.4；25 mmol/L $CaCl_2$；5% SDS；0.02% 溴酚蓝；30%甘油。

（10）电泳及其相关设备 [见注意事项（5）]。

（11）电泳电极缓冲液：15 mmol/L Tris，0.192 mol/L 甘氨酸，0.1% SDS（14.35 g 甘氨酸，1.75 g Tris，1 g SDS 溶于 1 L 水中）。

（12）2.5% Triton X-100（聚乙二醇辛基苯基醚）

（13）酶促反应缓冲液：0.05 mol/L Tris-HCl，pH 7.4；20 mmol/L NaCl；5 mmol/L $CaCl_2$；0.02%叠氮化钠。

（14）0.1% 胺基黑 B。

（15）30% 甲醇，10% 乙酸。

2.2 反酶谱法

除了明胶酶谱法中所需的试剂外，还需要重组人 MMP-9（cat. no. 2911，TECHNE Corporation，Minneapolis，MN）[见注意事项（6）]。

2.3 蛋白质印迹检测

除了明胶酶谱法中（2）～（10）种试剂外，还需要下列材料。

（1）PVDF（聚偏氟乙烯）膜（Immobilon™，Millipore，Boston，MA；cat. no. IPVH 304 F0）。

（2）甲醇。

（3）电转缓冲液：0.025 mol/L Tris，0.192 mol/L 甘氨酸，20%甲醇（即以 14.4 g甘氨酸、3 g Tris、200 ml 乙醇配制成 1 L 水溶液）。

（4）电转印仪器（如 Trans-Blot Cell and Systems，Bio-Rad，Hercules，CA）。

（5）石蜡封口膜。

（6）封闭缓冲液：含 4%牛血清白蛋白、0.05%Tween-20 的磷酸盐缓冲盐溶液。

（7）一抗：抗 MMP-9 或抗 TIMP-1 的单克隆抗体 [经 Bio-Rad 蛋白 A 琼脂糖凝胶柱纯化的 IgG 组分，见参考文献 [4] 和文献 [18]；或抗 TIMP-2 的单克隆抗体（Daiichi Fine Chemical，Toyama，Japan；cat. no. F-70）]。

（8）洗涤缓冲液：含 0.05%Tween-20 的磷酸盐缓冲盐溶液。

（9）二抗：辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 Ig 抗体（Amersham Biosciences，Little Chalfont Buckinghamshire，UK；cat. no. NA931V）。

（10）检测试剂和仪器：增强化学发光的蛋白质印迹检测试剂（Amersham Biosciences；cat. no. RPN2132)，带暗盒的 X 射线片。

3 方法

3.1 明胶酶谱法

明胶酶谱法由三个步骤构成：①电泳；②酶促反应；③胶的染色和脱色。

（1）准备电泳凝胶，即含 0.5%明胶的 7.5%丙烯酰胺-双丙烯酰胺凝胶。混合2.5 ml 电泳缓冲液、2.5 ml 30%丙烯酰胺、2 ml 2.5%明胶、2.7 ml 水、100 μl 10% SDS、10 μl TEMED 和 190 μl 10% 过硫酸铵。用一支 20 ml 的注射器［见注意事项（7）和（8）］抽取混合液，轻轻将其注入两块玻璃板中间，然后在胶表面覆盖上水，让胶聚合。

（2）准备浓缩胶，即 3%丙烯酰胺-双丙烯酰胺凝胶。混合 1 ml 浓缩胶缓冲液、400 μl 30%丙烯酰胺、2.4 ml 水、40 μl 10% SDS、4 μl TEMED 和 156 μl 10%过硫酸铵。轻轻混合，待分离胶聚合后，将其表面的水倾弃，并覆盖上浓缩胶，放入合适的梳子，然后让其聚合。

（3）用上样缓冲液稀释培养过角质形成细胞的条件培养基（4∶1 稀释，4 份培养基混合 1 份上样缓冲液），混合后不要煮沸［见注意事项（9）］。

（4）待浓缩胶聚合后拔掉梳子，加入电泳电极缓冲液，上样后开始电泳，恒压 80 V［见注意事项（10）］。

（5）电泳完成后，移去浓缩胶，分开玻璃板，并标记好胶（如可以剪去胶的一个角）以保持胶的定向，把胶放入 2.5% Triton X-100 中，摇动 60 min［见注意事项（11）］。

（6）把胶移入酶促反应缓冲液中，35℃孵育［见注意事项（12）～（14）］。

（7）0.1%胺基黑 B 摇荡染色［见注意事项（15）］。

（8）30%甲醇/10%乙酸振荡脱色［见注意事项（16）］。

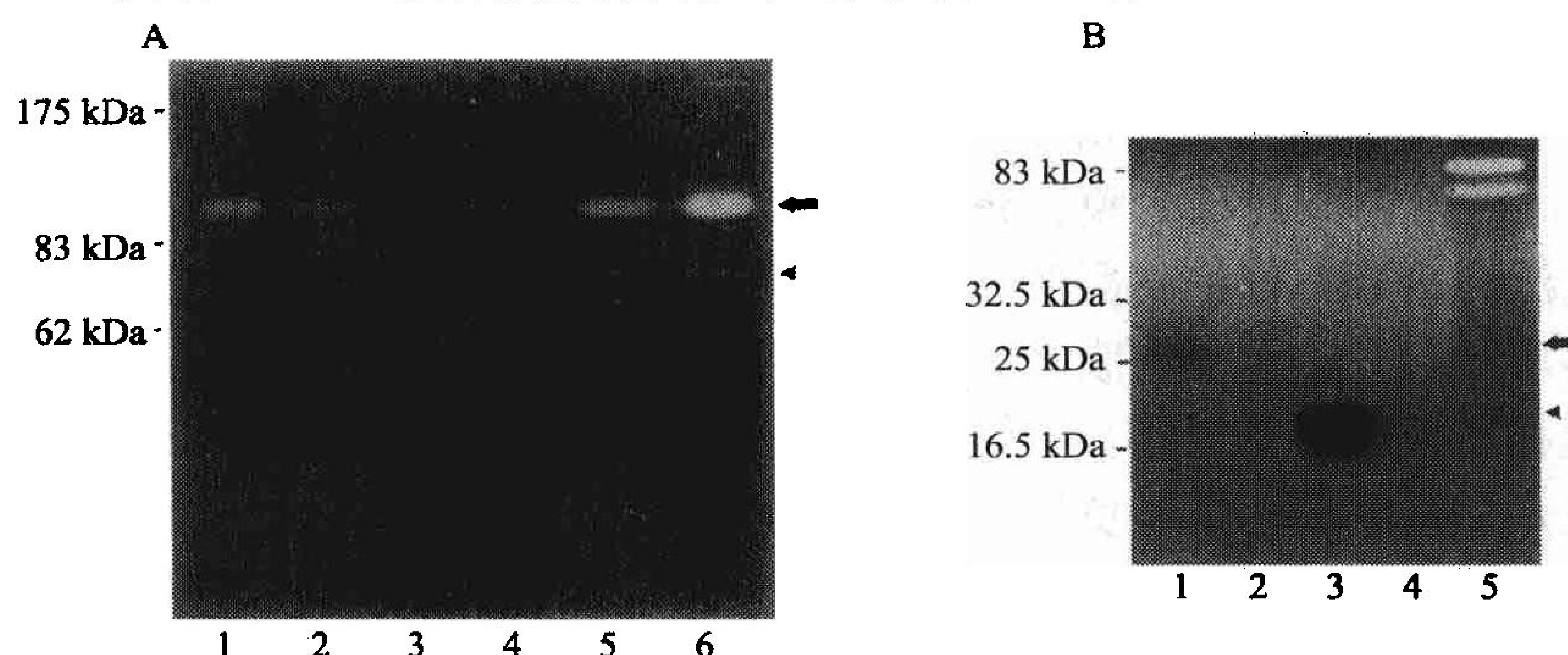


图 22.1 用 7.5%丙烯酰胺凝胶的明胶酶谱法（A）和用 7.5%丙烯酰胺凝胶的反酶谱法（B）

A. 1.5 ng（泳道 1）、500 pg（泳道 2）、170 pg（泳道 3）的重组人 MMP-9，给予高浓度钙离子刺激的培养有角质形成细胞的条件培养基（泳道 5），加入了转化生长因子（TGF）-β1 的角质形成细胞条件培养基（泳道 6），未加刺激的培养有角质形成细胞的条件培养基（泳道 4）。高钙离子诱导 MMP-9 有选择地分泌，而 TGF-β1 刺激 MMP-9 和 MMP-2 分泌。箭和箭头分别指示 MMP-9 和 MMP-2 的条带。B. 13 ng（泳道 1）和 4.3 ng（泳道 2）的重组人 TIMP-1（Daiichi Fine Chemical），13 ng（泳道 3）和 4.3 ng（泳道 4）的重组人 TIMP-2，培养有人类角质形成细胞的条件培养基（泳道 5）。条带显示了 MMP-9 和 MMP-2 的溶解明胶活性。箭和箭头分别指示 TIMP-1 和 TIMP-2。

（9）以一染过色的明胶作为背景，观察明胶降解的区域为透明的条带［图 22.1A，见注意事项（17）和（18)］。

3.2 反酶谱法

反酶谱法是以明胶酶谱法的相同原理为基础，由三个步骤组成：①电泳；②酶促反应；③胶的染色和脱色。

（1）准备电泳凝胶，即含 0.25％明胶的 12％丙烯酰胺-双丙烯酰胺凝胶。混合 2.5 ml电泳缓冲液、4 ml 30％丙烯酰胺、1 ml 2.5％明胶、2.2 ml 水、100 μl 10％ SDS、20 μl 10 μg/ml 重组人 MMP-9、10 μl TEMED 和 170 μl 10％过硫酸铵［见注意事项（7)、(8）和（19)］。然后按照本章 3.1 中步骤（2）～（4）进行电泳。

（2）电泳完成后，移去浓缩胶，分开玻璃板，取出凝胶，并标记好胶。把胶放入 2.5％ TritonX-100 中，摇动 30 min，重复三次，一共 90 min［见注意事项（11)］。

（3）把胶移入酶促反应缓冲液中，35℃振荡孵育［见注意事项（20)］。

（4）分别用 0.1％ 胺基黑 B 和 30％甲醇/10％乙酸对胶进行摇荡染色和脱色［见注意事项（15）和（16)］。

（5）以明胶降解的透亮区域为背景，观察未降解明胶的区域［见注意事项（17)］

3.3 蛋白质印迹法检测

蛋白质印迹法包括 4 个步骤：①电泳；②电转；③抗体-抗原结合反应；④信号检测［图 22.1B 和注意事项（21)］。

（1）制备 7.5％丙烯酰胺-双丙烯酰胺分离胶。即以 4.7 ml 水取代上述明胶酶谱法（见 3.1）检测 MMP-9 中的 2 ml 2.5％明胶和 2.7 ml 水。若是制备 15％丙烯酰胺-双丙烯酰胺分离胶，则以 5 ml 30％丙烯酰胺和 2.2 ml 水取代 2.5 ml 30％丙烯酰胺、2 ml 2.5％明胶和 2.7 ml 水［见注意事项（1）和（4)］。

（2）按 3.1 中的步骤（2）～（4）进行电泳。

（3）将 PVDF 膜浸泡于甲醇中 60 s。

（4）在 4℃预先将 PVDF 膜、滤纸、泡沫材料浸泡在电转缓冲液中。

（5）电泳完成后，仔细将凝胶、PVDF 膜、泡沫垫、滤纸、塑料板按图 22.2 组装成印迹的多层结构，避免胶和膜之间产生气泡，滤纸的大小一定要小于胶和膜，切忌正负极的滤纸相互接触导致短路。电转时，胶在正极，膜在负极［Bio-Rad 电转仪器的黑色端是正极，白色或浅色端是负极；见注意事项（22)］。

（6）80 V 电转 1 h，可将蛋白质转移至 PVDF 膜。把电转仪放入盛有冰块的水箱保持冷却，电转时不时搅拌，或者电转在 4℃进行。

（7）将石蜡封口膜贴附放入一个培养皿。

（8）电转完成后，将 PVDF 膜剪至凝胶的实际大小，蛋白质的一侧朝上放置于石蜡封口膜上。

（9）封闭缓冲液浸泡 PVDF 膜的蛋白质面，利用表面张力作用每 10 cm^2 膜大概需要 1 ml 封闭缓冲液，在 4℃浸泡 30 min［见注意事项（23)］。

（10）移去封闭液，将用封闭液稀释的一抗（5 μg/ml）浸泡膜，4℃孵育过夜［见

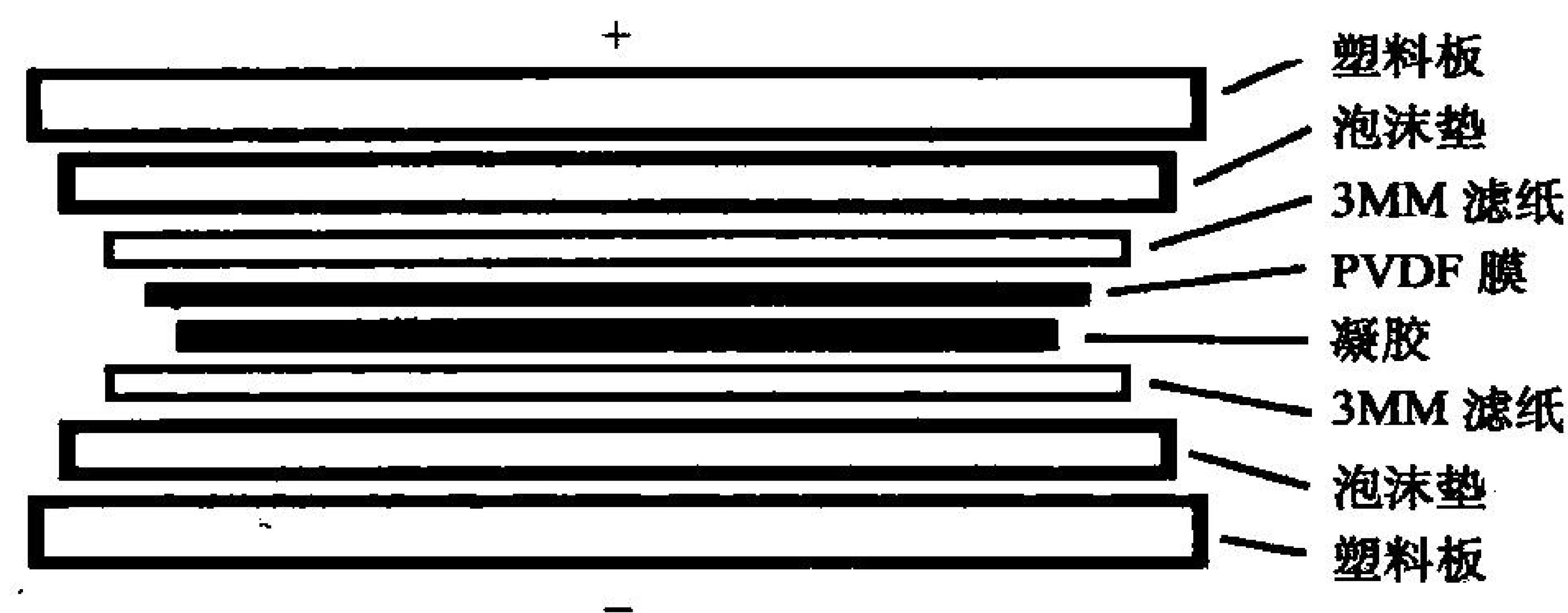


图 22.2 组装用于蛋白质印迹分析的印迹多层结构示意图

+代表正极，−代表负极。

注意事项（23）]。

（11）孵育过夜后的 PVDF 膜用洗涤缓冲液振荡洗涤 10 min，重复 3 次（一共 4 次，每次需换洗涤缓冲液）。

（12）将另一个石蜡封口膜贴附于培养皿底。

（13）用洗涤缓冲液稀释后的二抗（Amersham 二抗，10 000× 稀释）浸泡 PVDF 膜，4℃孵育 3 h [见注意事项（23）]。

（14）用洗涤缓冲液振荡洗涤 PVDF 膜 10 min，重复 3 次（一共 4 次，每次需换洗涤缓冲液）。

（15）增强化学发光试剂处理 PVDF 膜后，在暗盒内以 X 射线片曝光探测膜上的过氧化酶反应（图 22.3）。

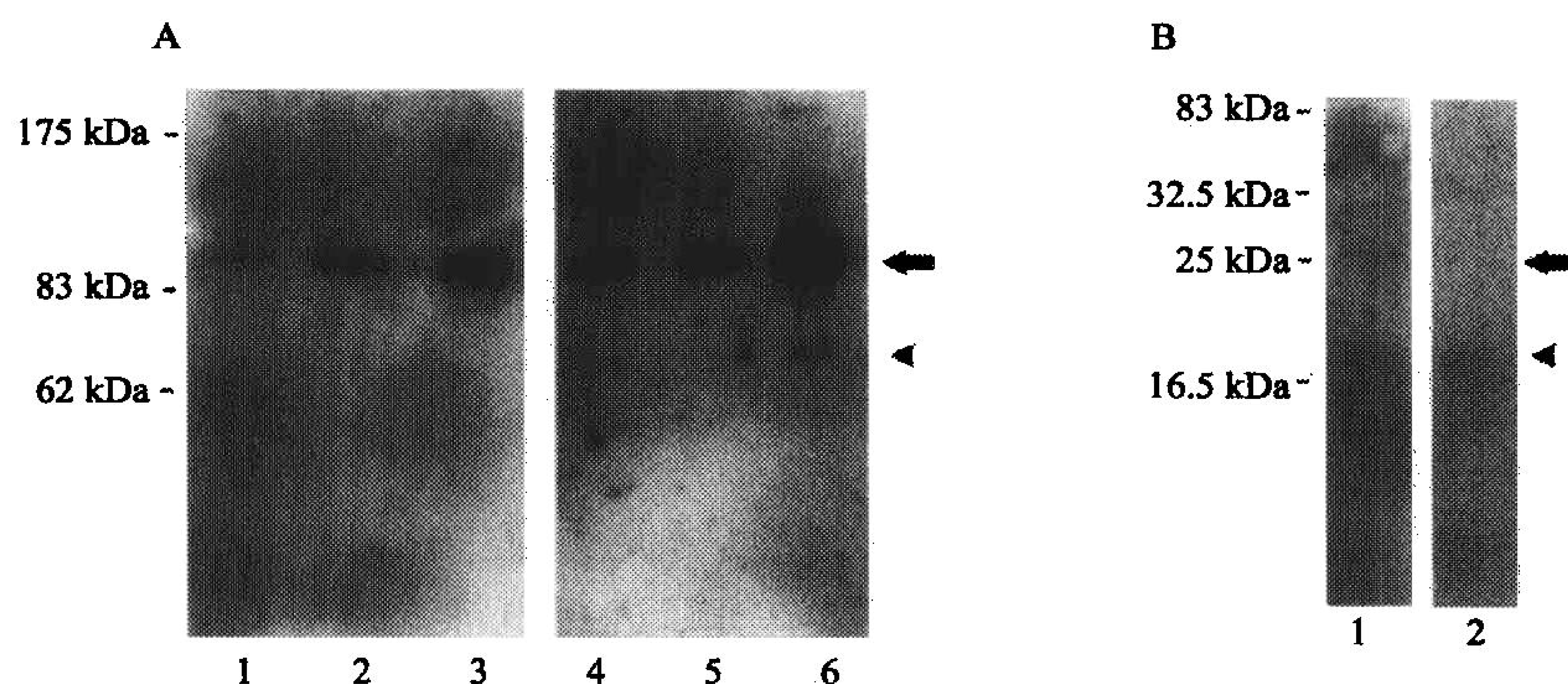


图 22.3 蛋白质印迹法检测 MMP-9（7.5%丙烯酰胺凝胶）（A）和 TIMP-1（15%丙烯酰胺凝胶）（B）

A. 培养有角质形成细胞的条件培养基，有高浓度钙离子刺激（泳道 2 和 泳道 5）；加入了 TGF-β1 刺激（泳道 3 和 泳道 6）；没有刺激（泳道 1 和泳道 4）。应用下列抗人 MMP-9 的单克隆抗体分析这些样本，不和 MMP-2 发生交叉反应的抗体（泳道 1、2 和 3）；可和 MMP-2 发生交叉反应的抗体（泳道 4、5 和 6，参考文献 [18]）。TGF-β1 诱导产生的 MMP-2 明显能被可以发生交叉反应的抗体检测到。箭和箭头分别代表 MMP-9 和 MMP-2。B. 用两种抗 TIMP 的单克隆抗体分析培养有角质形成细胞的条件培养基，抗人 TIMP-1 抗体（泳道 1；参考文献 [4]）；抗人 TIMP-2 抗体且与 TIMP-1 无交叉反应（泳道 2）。箭和箭头分别代表 TIMP-1 和 TIMP-2。

4 注意事项

（1）明胶（如 EIA Grade Reagent，Bio-Rad）在室温下较难溶解于水，在 40℃水浴中孵育则更易溶于水。

（2）必须使用无血清的培养基，因为血清本身就含有 MMP-2 和 MMP-9[19]。如果是 HaCaT 细胞或鼠源角质形成细胞，可以先培养在含有血清的培养基中，收集条件培养基检测明胶酶前才从有血清培养基中转移到无血清培养基中。

（3）根据我的经验，新鲜的条件培养基进行上述检测时在 4℃能相对稳定 48 h。请避免在 4℃储存条件培养基超过 2 d，或者在 4℃以上储存条件培养基。冰冻的样品更为稳定，然而反复的冰冻和解冻则会引起蛋白质的降解，并伴随蛋白质的聚集。

（4）因为丙烯酰胺单体具有神经毒性，请操作时注意防护。例如，在使用丙烯酰胺粉末和溶液时可以戴上口罩和手套。

（5）10 ml 的分离胶和 4 ml 的浓缩胶足够用于两套小型电泳槽（8.5 cm × 6 cm，1 mm厚）。

（6）TPA 诱导人 HT-1080 细胞的条件培养基或者用明胶-琼脂糖柱纯化的 MMP-9，也可用于替代重组人 MMP-9[16,20]。

（7）灌注分离胶前抽出分离胶中的空气，以避免在聚合的胶中产生气泡，因为气泡会使条带在电泳时候变形。我们通常使用 20 ml 的注射器来消除 10 ml 分离胶溶液的气泡。其方法是用石蜡封口膜密封注射器的开口，再外拔注射器芯约 5～10 ml 以产生负压，直到注射器内因负压而出现的气泡消失为止。

（8）凝胶聚合所需的时间取决于温度，低温时需要更长的时间。如果增加过硫酸铵的量，将会缩短胶聚合的时间；相反，如果在温度比较高的时候减少过硫酸铵的量，可以减慢胶的聚合。

（9）用样品缓冲液稀释样品后，样品的酶会由于缓冲液中的 SDS 作用而慢慢失活。所以在明胶酶谱法中，建议使用刚加入样品缓冲液后的新鲜样品。加入二硫苏糖醇或 β-巯基乙醇会降低酶的活性，应避免发生。

（10）过高的电泳电压会使胶变热，这会使酶促反应失活，所以推荐使用 100 V 以下的电压，如果实验环境温度特别高，建议在 4℃进行电泳。

（11）为了去除胶中的 SDS，用 Triton X-100 孵育和洗涤电泳后的胶是非常重要的，推荐每块胶（约 5 ml 的分离胶）用多于 100 ml 的 2.5% Triton X-100 进行洗涤和孵育。

（12）条件培养基所需的反应时间取决于酶的浓度，例如，在 48 孔板的一孔中接近铺满的角质形成细胞培养 24 h 可收集 100 μl 的条件培养基，取其中的 10～15 μl 经过夜孵育就足够观察到 MMP-9 的条带。

（13）明胶酶谱法是非常灵敏的方法，通常更长的孵育时间会产生更强的酶促反应。但是我们发现孵育 5 d 后，反应的灵敏度就受到了限制。我们认为过长的孵育时间会使酶从胶上扩散。

（14）明胶酶谱法不仅可以用于检测金属蛋白酶，也可以用于检测其他种类的酶，如丝氨酸蛋白酶。检测其他酶或者要证实 MMP 的溶明胶活性时，可以在反应缓冲液和

Triton X-100 中加入 10 mmol/L EDTA 以抑制金属蛋白酶的活性。

(15) 胺基黑 B 可以重复多次使用。首次使用时平均染色时间约 10 min，重复使用时要延长染色时间，也可以使用考马斯亮蓝 R-250 替代胺基黑 B。用紫外线透射仪配合荧光素——异硫氰酸盐标记的明胶可以用来监测溶明胶活性的反应，这就是实时明胶酶谱法和反明胶酶谱法[16]。

(16) 脱色时间可以是过夜或者更长时间。

(17) 胶在脱色液中会收缩。脱色后的胶在 0.02%叠氮化钠的水溶液中可以储存数天，按此法储存后，胶的分辨率将会相对地提高。扫描胶后可以用 NIH 的图像软件对条带的强度进行定量分析[14,15]。

(18) 当人角质形成细胞经数次传代，分泌到条件培养基中的 MMP-2 会有所减少[13]。

(19) 胶中的 MMP-9 会因为 SDS 而渐渐失活。因此，电泳应该在胶准备好后 2～3 h内进行。

(20) 反酶谱法中条件培养基的反应时间要长于明胶酶谱法的时间。例如，在 6 孔板的一孔中接近铺满的角质形成细胞培养 24 h 可收集 1.2 ml，用滤器 (Ultrafree、Millipore、Boston、MA) 可浓缩到 240 μl 样本，取其中的 10～15 μl 经过 3 d 反应很容易观察到 TIMP-1 的条带。此外，振荡孵育 (0.06～0.1 g，60～80 r/min) 对检测 TIMP 抑制 MMP-9 的活性至关重要。

(21) 在蛋白质印迹法的整个操作中，最好戴上手套避免指纹的污染。另外，在用甲醇浸泡 PVDF 膜后，避免 PVDF 膜干燥。

(22) 当组装蛋白质印迹的多层材料时，应仔细地移去各层之间的气泡，电转完成后应尽快实验，避免条带扩散和溶解丢失。

(23) 在二抗浸泡 PVDF 膜的过程中，如果没有石蜡封口膜覆盖，应当使用湿润的滤纸和盖上盖子以避免试剂的蒸发。

致　谢：本研究由日本科学促进会的科学研究基金资助。

（陈　杰 译　刘泽军 校）

参考文献

[1] Birkedal-Hansen, H. (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 728—735.

[2] McCawley, L. J. and Matrisian, L. M. (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 534—540.

[3] Stahle-Backdahl, M. and Parks, W. C. (1993) 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **142**, 995—1000.

[4] Kobayashi, T., Onoda, N., Takagi, T., Hori, H., Hattori, S., Nagai, Y., et al. (1996) Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 239—244.

[5] Fisher, G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1419—1428.

[6] Liu, Z., Zhou, X., Shapiro, S. D., Shipley, J. M., Twining, S. S., Diaz, L. A., et al. (2000) The ser-

pin α1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* **102**, 647—655.

[7] Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., and Werb, Z. (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* **103**, 481—490.

[8] Kobayashi, T., Kishimoto, J., Ge, Y., Jin, W., Hudson, D. L., Ouahes, N., et al. (2001) A novel mechanism of matrix metalloproteinase-9 gene expression implies a role for keratinization. *EMBO Rep.* **2**, 604—608.

[9] Mohan, R., Chintala, S. K., Jung, J. C., Villar, W. V., McCabe, F., Russo, L. A., et al. (2002) Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J. Biol. Chem.* **277**, 2065—2072.

[10] Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* **264**, 17 213—17 221.

[11] Salo, T., Lyons, J. G., Rahemtulla, F., Birkedal-Hansen, H., and Larjava, H. (1991) Transforming growth factor-β1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 11 436—11 441.

[12] Kleiner, D. E. and Stetler-Stevenson, W. G. (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal. Biochem.* **218**, 325—329.

[13] Kobayashi, T., Hattori, S., Nagai, Y., Sakuraoka, K., and Nishikawa, T. (1997) Secretion of different types of gelatinases from cultured human keratinocytes. *J. Dermatol.* **24**, 213—216.

[14] Kobayashi, T., Hattori, S., Nagai, Y., Tajima, S., and Nishikawa, T. (1998) Differential regulation of MMP-2 and MMP-9 gelatinases in cultured human keratinocytes. *Dermatology* **197**, 1—5.

[15] Kobayashi, T., Hattori, S., Nagai, Y., and Tajima, S. (2000) Differential regulation of the secretions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 from human keratinocytes in culture. *IUBMB Life* **50**, 221—226.

[16] Hattori, S., Fujisaki, H., Kiriyama, T., Yokoyama, T., and Irie, S. (2002) Real-time zymography and reverse zymography: a method for detecting activities of matrix metalloproteinases and their inhibitors using FITC-labeled collagen and casein as substrates. *Anal. Biochem.* **301**, 27—34.

[17] Oliver, G. W., Leferson, J. D., Stetler-Stevenson, W. G., and Kleiner, D. E. (1997) Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Anal. Biochem.* **244**, 161—166.

[18] Kobayashi, T., Hori, H., Kanamori, T., Hattori, S., Takagi, T., Watanabe, H., Nishikawa, T., and Nagai, Y. (1993) Monoclonal antibodies to human polymorphonuclear leukocyte gelatinase (type IV collagenase) are cross-reactive with fibroblast gelatinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 490—496.

[19] Vartio, T. and Baumann, M. (1989) Human gelatinase/type IV procollagenase is a regular plasma component. *FEBS Lett.* **25**, 285—289.

[20] Kobayashi, T., Nishikawa, T., Hattori, S., Yoshida, N., Takagi, T., Watanabe, H., et al. (2001) Systematic separation and purification of elastase, gelatinase (matrix metalloproteinase9), and collagenase (matrix metalloproteinase 8) from polymorphonuclear leukocytes in dialyzers previously used by patients with renal failure. *Protein Expr. Purif.* **22**, 45—51.

第 23 章　毛囊上皮细胞表达 S100 蛋白的特征

Kenji Kizawa，Mayumi Ito

摘　要：S100 蛋白是具有 EF-手结构基序的钙离子结合蛋白中最大的亚群。这个蛋白家族一个独特的特点是每个家族蛋白成员都定位于特定的细胞区域。不同种类的 S100 蛋白表达于毛囊某些非常局限的区域，例如，S100A3 和 S100A6 明显分布于有丝分裂后的已分化上皮细胞，而 S100A4 和 S100A6 在上皮干细胞表达。因而，研究上皮细胞表达 S100 蛋白的特点有助于更好地理解伴随毛囊发育和再生的动态细胞变化。本章介绍有关毛囊组织中 S100 蛋白探针制备和组织化学分析的实验方法，包括脉冲标记增殖细胞的同步检测步骤。

关键词：S100 蛋白；毛囊；原位杂交；免疫组化；BrdU

1　导言

毛发以周期性方式生长（anagen 是生长期，中间期 catagen 是退行期，telogen 是休止期）。在生长期毛囊，毛囊球部的上皮母质细胞增殖，最终分化成形态各异的 6 类不同细胞（毛干的毛小皮、皮质和髓质；内根鞘的鞘小皮、Henle 层和 Huxley 层）。然而在退行期，毛囊的下段上皮部分退化成休止期毛囊的两层上皮囊。由于在整个毛发生长周期毛囊都保留有上皮干细胞，所以出生后毛发能够反复自我更新。

毛囊是一个研究组织再生机制特征及其潜在细胞活动的有用的生物体系，这些细胞活动包括增殖、分化和凋亡。毛囊是由几种独特的上皮层组成的复合结构，然而这些上皮层都是在毛发周期转换过程中转化过来的，因而要精确地鉴别组织切片中不同的细胞类型和组织切片的不同层次常常是困难的，正是这样，一个能够鉴别毛囊特定层次的生物化学标记仍然是必需的手段。

S100 蛋白是具有 EF-手结构基序的钙离子结合蛋白家族中最大的亚群，现已证实有 20 多种蛋白质[1]，不同的 S100 蛋白具有不同的生理功能，但均受到一种钙依赖方式的调节。S100 蛋白的一个特性就是每个蛋白质成员都限定在特定细胞群体或者特定组织的区域，S100A3 在毛囊中的表达就是一个显著的例子，它主要表达在毛小皮和皮质[2,3]，而 S100A6、S100A8 和 S100A9 则特异性表达在其他分化的各种毛囊细胞[4,5]。最近我们发现毛囊（隆突）干细胞区域在毛发生长周期中均表达 S100A4 和 S100A6 蛋白[6,7]，而且有的研究利用 S100 蛋白表达来作为毛囊组织的生化标记物，有助于阐明一些基因的新功能[8]和毛囊的再生机制[7]。

本章我们将介绍用于研究鼠毛囊组织 S100 蛋白表达的探针制备和组织化学检测的方法，也为同步检测 S100 信号提供脉冲标记的增殖细胞检测技术。

2 材料

2.1 探针制备

2.1.1 RNA 探针的产生

（1）RNaid plus 试剂盒（RNaid plus kit，Bio 101，Vista，CA；cat. no. 1009-200）。

（2）酸性苯酚混合溶液：取在 50℃下融化的苯酚 70 ml 加入苯酚缓冲液 30 ml（由 RNaid plus 试剂盒提供）。使用前静置过夜。

（3）用于 PCR 的高级逆转录（RT）试剂盒（Clontech，Palo Alto，CA；cat. no. K1402）。

（4）耐热 DNA 聚合酶（Advantage 2 PCR Enzyme System，Clontech；cat. no. K1910）。

（5）DNA 纯化试剂盒（Toyobo，Osaka，Japan；cat. no. PUR-101）。

（6）配有高效率感受态细菌 JM109 的 pGEM-T 载体系统 II（Promega，Madison，WI；cat. no. A3610）。

（7）SOC 培养基（Gibco BRL；Gaithersburg，MD；cat. no. 15544-034）。

（8）LB 培养基：1 L 内含 10 g 细菌用胰蛋白胨、5 g 细菌用酵母菌提取物和 5 g 氯化钠（用 NaOH 调整到 pH 7.0），高压灭菌。

（9）含氨苄青霉素/IPTG/X-gal 的 LB 板：高压灭菌含有 3 g 琼脂的 200 ml LB，冷却至 50℃时，再加入过滤灭菌的 0.8 ml 氨苄青霉素（25 mg/ml）、1 ml 0.1 mol/L IPTG 和 0.32 ml X-gal（50 mg/ml 二甲基甲酰胺；Promega；cat. no. V3941）。将 20 ml 培养基倒进 90 mm 培养皿中，让琼脂凝固。

（10）质粒抽提试剂盒（QIAprep spin plasmid kit，Qiagen，Chatsworth，CA；cat. no. 27104）。

（11）RNA 标记试剂盒（Roche Diagnostics，Mannheim，Germany；cat. no. 1 175 025）。

2.1.2 抗体产生

（1）Applied Biosystems 公司能够提供所有多肽合成的试剂，包括 N-（9-芴）甲氧羰基（Fmoc）和多价抗原性肽（MAP）树脂（Applied Biosystems，Foster City，CA；cat. no. 401192 for 4-branching lysine core，401193 for 8-branching lysine core）。

（2）聚四氟乙烯滤器（Advantec，Tokyo，Japan，cat. no. PF060），3 μm 聚四氟乙烯滤器（Advantec；cat. no. T300A）。

（3）MAP 包被 ELISA 板：根据 3.1.2.1 将 MAP 溶解于 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液中（pH9.6），在 ELISA 板（IMMULON2 ELISA titer plate，Dynatech Laboratory，Chantilly，VA；cat. no. 011 0103455）的每个孔中滴加 MAP 溶液（1 μg/100 μl），4℃过夜。

（4）抗体纯化柱（Affi-Prep 10，Bio-Rad，Hercules，CA；cat. no. 153-6099）。

(5) 蛋白萃取缓冲液：50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.5，内含 1%Triton X-100、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EGTA 和 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟化物（PMSF，50 mg/ml 异丙醇溶液，每 100 ml 缓冲液中加入 350 μl）。

(6) Bicinchoninic 酸性蛋白测试盒（Pierce，Rockford，IL；cat. no. 23225）。

(7) 阳极缓冲液：24.2 g Tris/L，用 HCl 调整到 pH 8.9。

(8) 阴极缓冲液：配制 1 L，加入 12.1 g Tris、17.9 g tricine（一种两性离子缓冲剂）和 1 g SDS，pH 8.2～8.3。

(9) 凝胶缓冲液：每 200 ml 加入 72.7 g Tris 和 0.6 g SDS；用盐酸调 pH 至 8.45。

(10) 浓缩用丙烯酰胺（3%C）：每 100 ml 加入 48 g 丙烯酰胺、1.5 g 双丙烯酰胺。

(11) 分离用丙烯酰胺（6%C）：每 100 ml 加入 46.6 g 丙烯酰胺、3.0 g 双丙烯酰胺。

(12) 10%过硫酸铵（APS）。

(13) *N*，*N*，*N'*，*N'*-四甲基乙二胺（TEMED；Sigma，St Louis，MO；cat. no. T-7024）。

(14) 样品缓冲液：每 100 ml 加入 12 ml 甘油、10 ml 0.5 mol/L Tris-HCl（pH 6.8）4 g 十二烷硫酸钠（SDS）、2 ml β-巯基乙醇。

(15) 转移缓冲液：每 1 L 加入 12.1 g Tris、14.4 g 甘氨酸、200 ml 甲醇。

(16) 预染色分子质量标记：Kalidoscope 标准多肽（Bio-Rad；cat. no. 161-0325）。

(17) 印迹膜 Immobilon-P^{SQ}（Millipore，Bedford，MA；cat. no. ISEQ26260）：剪成 8.4 cm × 6.5 cm，先用甲醇浸蘸一下，再预浸泡于转移缓冲液中。

(18) 封闭缓冲液 A：每 20 ml 磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）加入 1 g BSA。

(19) 封闭缓冲液 B：每 20 ml PBS 加入 0.4 g BSA。

2.2 标本准备

(1) 去毛蜡的配制：沸水浴上融化 5.5 g 白蜂蜡和 4.5 g 松香（可供处理 10 只小鼠）。避免反复使用。

(2) 5-溴-2'-脱氧尿核苷（BrdU）（Sigma；cat. no. B-9285）。

(3) 4%多聚甲醛/PBS：20 g 多聚甲醛溶解在 450 ml PBS 中，加入数滴 10 mol/L NaOH 溶液，置于加热搅拌器上数小时。冷却后将溶液调整至 pH 7.4。加入 PBS 直到总体积达 500 ml。

(4) 石蜡（凝点 56～58℃；Merck，Darmstadt，Germany；cat. no. 1.07164）。

(5) Superfrost APS 包被的显微载玻片（Matsunami，Kishiwada，Japan；cat. no. S8441）。

2.3 组织化学

2.3.1 原位杂交

(1) DAKO 笔（DakoCytomation，Carpintera，CA；cat. no. S2002）。

(2) 蛋白酶 K（Roche Diagonostics；cat. no. 745723）：用 TE 溶液配成 20 mg/ml，

再分装成每份 100 μl，储存于－20℃。

（3）碱性磷酸酶结合的山羊抗地高辛配基抗体 Fab 片段（Roche Diagonostics；cat. no. 1093274）。

（4）TE：0.1 mol/L Tris，50 mmol/L EDTA，pH 8.0。

（5）三乙醇胺/无水乙酸：将焦碳酸二乙酯（DEPC）处理过的水 95 ml、1.5 g 三乙醇胺、3 ml 5 mol/L NaCl 和 0.4 ml HCl 混合，用前立即在混合液中加入无水乙酸 250 μl。

（6）杂交混合物。混合下列试剂：10 ml 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0），50 ml 甲酰胺，25 ml 20×标准枸橼酸钠（SSC），2 ml 50× Denhardt 溶液（Wako，Osaka，Japan；cat. no. 043-21871），10 g 右旋糖酐硫酸酯（10%），0.2 ml 10%十二烷基硫酸钠，25 mg 酵母 tRNA，2 g 封闭试剂，100 mg *N*-十二烷酰甲基甘氨酸（lauroyl sarcosine）；用 DEPC 处理过的水将总体积加至 100 ml，分装成每管 1 ml，－20℃保存。

（7）马来酸盐缓冲液：0.1 mol/L 马来酸，0.15 mol/L NaCl，pH 7.5。

（8）NBT/BCIP 储备液（Roche Diagonostics；cat. no. 1681451）。

2.3.2 免疫染色

（1）用于兔 IgG 和大鼠 IgG 的 Vectastain Elite ABC 试剂盒（Vector Laboratory，Burlingame，CA；cat. no. PK-6101，PK-6104）。

（2）Vectastain ABC-AP 试剂盒（Vector Laboratory；cat. no. AK-5001）。

（3）DAB 底物试剂盒（Vector Laboratory；cat. no. SK-4100）。

（4）Vector 蓝底物试剂盒（Vector Laboratory；cat. no. SK-5300）。

（5）快速封固剂 Mount-Quick（Daido Sangyo，Toda，Japan）。

2.3.3 BrdU 标记细胞的检测

（1）小鼠抗 BrdU 单克隆抗体（Becton Dickinson，San Jose，CA；cat. no. 347580）。

（2）大鼠抗 BrdU 单克隆抗体（Harlan Sera-Laboratory，Loughborough，UK；cat. no. OBT0030）。

3 方法

3.1 探针制备

在 S100 蛋白家族的 18 个真正成员中，几乎所有人类和鼠科的 cDNA 都已经被克隆，可以在公共数据库（如 www. ncbi. nlm. nih. gov/Fenbank/index. html，见表 23.1）里查到它们的核苷酸序列和推演出的氨基酸序列。这些信息可以帮助我们制备 S100 蛋白的核酸探针和抗体，进而分析这些蛋白质的表达和组织分布。这部分内容主要是介绍适用于鼠类 S100A3、S100A4 和 S100A6 的探针制备方法[2,3,6]。

表 23.1　S100 cDNA 的数据库索引号码

	人类	小鼠	大鼠
S100A1	X58079	AFO87687	S68809
S100A2	NM _ 005978		
S100A3	Z18948	AFO004941	AF140231
S100A4	M80563	X05835	J03628
S100A5	Z18954	AF087469	
S100A6	M18981	X66449	AF140232
S100A7	M86757	AY582964	
S100A8	Y00278	S57123	L18591
S100A9	M26311	M83219	L18948
S100A10	M28591	M16465	J03627
S100A11	D38583	AK003889	
S100A12	D83664		
S100A13	X99920	X99921	
S100A14	AY007220	AK003669	
S100A15	NM _ 176823		
S100A16	NM _ 080388		
S100B	AH002981	NM _ 009115	X01090
S100P	X65614		

3.1.1　RNA 探针的制备

3.1.1.1　用 RNaid Plus 试剂盒制备总 RNA

（1）将切取的皮肤组织（约 200 mg）在 1 ml 细胞溶解液中匀浆。

（2）把 750 μl 匀浆液加入到 2 ml 的微量离心（Eppendorf）管。

（3）加入 75 μl 3 mol/L 乙酸钠和 750 μl 酸性苯酚混合液，涡旋混匀。

（4）加入 410 μl 氯仿/异戊醇（24∶1），涡旋混匀，冰上孵育 15 min。

（5）4℃离心 10 000 *g*，20 min，将含有 RNA 的上相液移到新管。

（6）加入 820 μl 氯仿/异戊醇，涡旋混匀。

（7）离心 5 min，将上相液移到 1.5 ml 的微量离心管。

（8）加入 20 μl RNAMATRIX，室温孵育，不时搅拌。

（9）离心 5 min，在 500 μl RNA 洗涤液中重悬沉淀物，反复洗涤两次。

（10）离心 5 min，去掉液相部分。

（11）加入 20 μl DEPC 水，55℃孵育 5 min。

（12）离心 5 min，将含有总 RNA 的上清液保存在－70℃。

3.1.1.2　用 Advanced RT PCR 试剂盒合成 cDNA 模板

（1）将 1 μl oligo（dT)$_{18}$引物（20 μmol/L）加入 1 μg 总 RNA/12.5 μl DEPC 水中混合。

（2）给试管加热直至 70℃，2 min，然后冷却至 4℃。

（3）加入 4 μl 5× 反应缓冲液，1 μl dNTP 混合物（每种 10 mmol/L），0.5 μl 核

糖核酸酶抑制剂，1 μl 莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶（MMuLV-RT）。

（4）在 42℃孵育 1 h，然后加热至 94℃，孵育 5 min。

（5）用 80 μl DEPC 水稀释，保存在－70℃。

3.1.1.3 PCR 引物制备

（1）利用软件工具（如 primer3；www-genome. wi. mit. edu/cgi-bin/primer/primer3 _ www. cgi）为每一种 *S100* 基因设计特异序列的引物对。

（2）用 DNA 合成仪合成引物［见注意事项（1）］。

3.1.1.4 用耐热 DNA 聚合酶（如 Advantage 2 PCR 酶系统）进行 cDNA 扩增

（1）将 40 μl PCR 等级的水、5 μl 10× PCR 缓冲液、1 μl cDNA 模板、2 μl 引物对（每条引物 10 μmol/L）、1 μl dNTP 混合液（每种 10 mmol/L）和 1 μl 聚合酶混合。

（2）开始热循环，参数如下：95℃，1 min；30 个循环，每个循环 95℃、15 s，68℃、3 min。

3.1.1.5 用 DNA 纯化试剂盒进行 DNA 纯化

（1）在 1.5%琼脂糖凝胶上进行 PCR 产物电泳。

（2）切下适当大小的 DNA 带凝胶，转至一已称重量的 1.5 ml 微量离心管。

（3）加入 6 mol/L NaI（每 100 mg 凝胶加 300 μl），然后在 55℃下，融化凝胶 3 min。

（4）加入 5 μl 硅胶乳（silicamilk），冰上孵育 10 min，然后离心 2 min。

（5）在 0.5 ml 冰冷的凝胶洗涤缓冲液中重悬沉淀物，离心 2 min，重复洗涤步骤两次。

（6）用 5 μl TE 缓冲液悬浮沉淀物，55℃洗脱 DNA 3 min，然后离心 30 s。重复洗脱两次，收集两次的上清液。

3.1.1.6 用 T4 DNA 连接酶连接 PCR 产物与 pGEM-T 载体（含有 T7 和 SP6RNA 聚合酶启动子）

（1）将 10～15 ng PCR 产物（200～300 bp）、1 μl T4 DNA 连接酶的 10× 缓冲液、1 μl pGEM-T 载体（50 ng）、1 μl T4 DNA 连接酶（3U）混合，加入 dH_2O 直至总体积为10 μl。

（2）吹吸混合反应物，4℃孵育过夜。

3.1.1.7 用蓝白斑筛选方法进行转化株的转化和选择

（1）在冰上加 2 μl 连接反应物至已消毒的 1.5 ml 微量离心管。

（2）加入 50 μl 刚刚解冻的大肠杆菌 JM109 感受态细菌，轻打试管混合均匀。

（3）将试管置于冰块上 20 min。

（4）42℃水浴加热 45～50 s，然后在冰上冷却 2 min。

（5）加入 950 μl SOC 培养基，37℃摇动孵育（约 150 r/min）1.5 h。

（6）将 100 μl 转化培养物［见注意事项（2）］铺种于含有氨苄青霉素/IPTG/X-gal 的 LB 板上。

（7）37℃孵育过夜。

（8）选择单一白色克隆，接种于 5 ml LB 培养基中，37℃过夜生长。

(9) 用质粒制备试剂盒（如 QIAprep spin plasmid kit）从大肠杆菌 JM109 分离质粒 DNA。

3.1.1.8 体外转录

(1) 用适当的限制性内切核酸酶使质粒 DNA（1 μg）线性化。

(2) 在反应混合物中加入等体积的 TE 饱和苯酚，以 10 000 *g* 离心 5 min，然后将上相液移入新管。此步骤重复两次。

(3) 加入等体积的氯仿/异戊醇，离心 5 min，将上面部分移至新管。

(4) 用乙醇沉淀上清液中的 DNA。

(5) 将沉淀物溶解在 13 μl DEPC 处理过的蒸馏水中，加入 RNA 标记试剂盒中的试剂（2 μl NTP 标记混合物，2 μl 转录缓冲液，1 μl RNase 抑制剂，2 μl RNA 聚合酶 SP6 或 T7），37℃孵育 2 h。

(6) 加入 2 μl 0.2 mol/L EDTA（pH 8.0）终止反应。

(7) 加入 2.5 μl 4 mol/L LiCl 和 75 μl 冷乙醇，然后将管放置于－70℃，2 h。

(8) 离心后，加入 100 μl DEPC 处理过的水，以溶解沉淀的地高辛配基标记 RNA 探针。

3.1.2 抗体制备［见注意事项（1）］

3.1.2.1 MAP 合成[9]

(1) 根据 S100 蛋白的氨基酸比例，采用软件工具（如 ProtScale，www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl）计算局部亲水性[10]。

(2) 将最高平均比例的氨基酸序列鉴定为抗原决定簇［见注意事项（3)］。

(3) 使用固相多肽合成仪（431A solid-phase peptide synthesizer），根据 2-（1H-苯并三唑-1-烃基）-1，1，3，3-四甲基脲阳离子六氟磷酸盐活化方案，按顺序加入 9-芴甲氧羰基（Fmoc）保护的氨基酸到 4-或 8-分支的赖氨酸核，从而合成出以赖氨酰残基作内核而以多拷贝的肽抗原作外表层的分支状合成肽（MAP）。

(4) 将 MAP 树脂（100 mg）移入带有微量搅拌棒的圆底瓶中。

(5) 在冰浴上，加入分裂混合物［如 4.75 ml 三氟乙酸（TFA）/0.25 ml 乙烷二硫醇（ethanedithiol）/0.25 ml H_2O；参考分裂技术使用说明，Applied Biosystems］。

(6) 室温下搅拌 3～5 h。

(7) 将反应混合物加到装有聚四氟乙烯滤器的玻璃漏斗中，然后将漏斗放在真空过滤瓶上。

(8) 用 1 ml TFA 和 5～10 ml 二氯甲烷洗涤树脂。

(9) 在低于 40℃条件下用旋转蒸发器把过滤混合物的体积浓缩至 1～2 ml。

(10) 加入 50 ml 冷乙醚。

(11) 用 PTFE 滤器去掉溶剂。

(12) 用 2 mol/L 乙酸溶解沉淀在滤器上的 MAP 沉淀。

(13) 在 4℃以 0.2 mol/L 乙酸透析，然后冻干。

3.1.2.2 抗体制备

(1) 兔皮下首次注射 MAP（250 μg/0.5 ml）和 0.5 ml 完全 Freund 佐剂的乳化混

合物。后续的加强注射则可用不完全 Freund 佐剂，每三周一次。

（2）每次抗原注射后一周，耳静脉收集兔血 1～2 ml，1000 *g* 离心 15 min。

（3）用 MAP 包被板通过 ELISA 方法测定所获血清的滴度。

（4）当 ELISA 测得的滴度到达平台相时［见注意事项（4）］，从颈动脉收集全部兔血（>60 ml），离心，收集抗血清。

（5）用 MAP 结合的 Affi-Prep 10 柱纯化抗血清中的特异抗体。

3.1.2.3 蛋白质印迹分析法检测抗体的特异性［见注意事项（5）］

（1）在 2～3 倍容量的冷萃取缓冲液中溶解已剪碎的皮肤组织碎片 10 min。

（2）以牛血清白蛋白作为标准，用 BCA 法测定蛋白质浓度。

（3）分离胶（16.5%T）制作：取分离用丙烯酰胺（6%C）、凝胶缓冲液和 40%甘油各 5 ml 混合后排出气体。加入 150 μl 10% APS 和 15 μl TEMED 后，搅拌混匀组合物，再灌入装有间隔框的玻璃板装置（容积为 8 cm × 8 cm × 0.1 cm）中。轻轻加入蒸馏水以覆盖凝胶的表面，静置 20 min，以便分离胶聚合。

（4）浓缩胶制作：取 1 ml 浓缩用丙烯酰胺（3%C）、3.1 ml 凝胶缓冲液、含有 150 μl 10%APS 和 20 μl TEMED 的蒸馏水 8.4 ml，将上述试剂混合后排出气体。将此混合溶液小心加于已倾去蒸馏水的分离胶的上面，注意完全填满梳子周围的空间（样本孔），静置 10 min，以便浓缩胶聚合。

（5）将凝胶安放在电泳装置上，注满阴极和阳极缓冲液槽，冲洗掉未聚合的丙烯酰胺。

（6）将蛋白质提取物（10～100 μg）或是预染色的分子质量标记物，与样品缓冲液混合，95℃加热 2 min，然后将各混合液分别加入凝胶孔中。

（7）设置为恒定电流 12 mA，电泳 16 h。

（8）在印迹仪（AE-6677；Atto，Tokyo，Japan）中，按序叠放 7 张层析纸、一张预先处理过的聚偏氟乙烯（PVDF）膜、凝胶和另外 7 张层析纸。

（9）将电流设置成 110 mA，开始电印迹，1 h。

（10）将已转印的 PVDF 膜依次浸入下列溶液。

a. 封闭缓冲液 A，2 h。

b. 1 μg/ml 亲和纯化的抗体，或者 1000～10 000 倍稀释的抗血清/封闭缓冲液 B，1 h。

c. PBS-T，三次，5 min。

d. 生物素化的山羊抗兔 IgG 抗体/封闭缓冲液 B，30 min。

e. PBS-T，三次，5 min。

f. 亲和素-过氧化物酶/封闭缓冲液 B，30 min。

g. PBS-T，三次，5 min。

h. 4 mg 二氨基联苯胺（DAB）/20 ml PBS/10 μl 30%H_2O_2，2～10 min。

i. 蒸馏水，3 min。

3.2 毛囊组织切片制备

小鼠体毛毛囊是毛发生长周期生物学研究中首选的实验材料。由于出生后毛发为同

步生长，所以我们利用背部皮肤组织，能够确定性地分析毛发生长周期的特定阶段（如第 6～9 d 为生长期，第 18～19 d 为退行期，第 8 W 时为休止期）[12]。而且，我们能够在毛发生长的休止期通过拔毛的方法实验性地诱导出生长期，再者，拔毛法诱导的毛发生长周期的时间进程也已完全确定[13]。动物处死前给予 BrdU 能够精确区分毛囊中哪些是短暂扩增细胞区域，哪些是有丝分裂后分化细胞区域，如 3.4 所述。

3.2.1 生长期的实验诱导

（1）在 8 周龄小鼠背部涂抹去毛蜡。

（2）蜡变硬后，轻轻拔除去毛蜡所包埋的背部软毛。

3.2.2 用 BrdU 进行脉冲标记的步骤

（1）给实验动物腹腔内注射 BrdU（20 mg/kg 体重）。

（2）90 min 后继续下面的步骤。

3.2.3 组织制备

（1）剪刀去除毛发后切取背部皮肤组织。

（2）4%多聚甲醛/PBS 固定组织 16 h，4℃。

（3）组织用乙醇脱水 3 次，每次 1 h；再用二甲苯透明 3 次，每次 15 min。

（4）用 58℃石蜡浸润组织 4 次，每次 1 h，然后包埋。

（5）用薄片切片机将蜡块切成 6 μm 厚的组织切片，漂浮在温热（37℃）的 DEPC 处理过的水上，以便切片展开。

（6）将组织切片裱在 APS 包被的玻片上，37℃干燥过夜。

3.3 从 S100 mRNA 和蛋白质的分布来鉴定毛囊组织

本节介绍的是在毛囊组织切片上，用原位杂交检测 S100 mRNA 和用免疫组化检测 S100 蛋白的最佳方法［见注意事项（6）］。生长期毛囊球部的上皮基质细胞分化成为毛干的三层结构（髓质、皮质和上皮）和内根鞘的三层结构（鞘小皮、Huxley 层和 Henle 层）。我们已经确定 S100A3 mRNA 和蛋白质主要位于毛干的毛小皮中，皮质部分较少（图 23.1A；参考文献［3］），而 S100A6 mRNA 位于内根鞘的 Hexley 层、外根鞘的最内层细胞和髓质中（图 23.1B）。在内根鞘的 Henle 层或鞘小皮层，这两种蛋白质的染色都是阴性。生长期毛囊 S100A3 和 S100A6 的分布如示意图 23.1C 所示。

休止期毛囊的上皮部分由围绕杵状毛发和次级毛胚芽的双层上皮囊组成。立毛肌的附着点指的是隆突区，后者与上皮囊的外层难以区分。抗 S100A4 抗体在这个区特异着色，但在次级毛胚芽则否（图 23.2A）。相反，抗 S100A6 抗体在上皮囊的内层染色要比外层强得多（图 23.2B）。因此，S100 蛋白抗体可以通过生物化学技术来区分休止期毛囊的三个上皮区（如上皮囊的内、外层及毛胚芽，图 23.2C，参考文献［6］、［7］）。

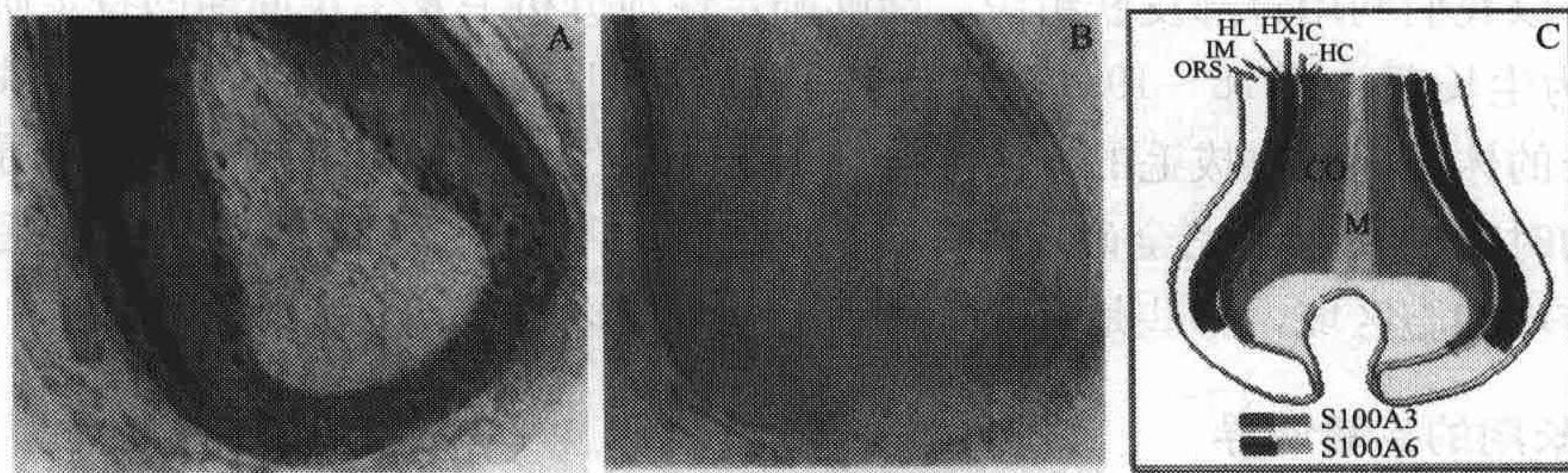


图 23.1 S100A3 和 S100A6 mRNA 在生长期毛囊中的定位分布

A. 对经 BrdU 处理过的大鼠的生长期触须毛囊行 S100A3 mRNA 原位杂交，继之再行 BrdU 免疫组化染色。毛干的毛小皮层和皮质层可见染色，但以 BrdU 脉冲标记的增殖基质细胞不着色。B. 对大鼠的生长期触须毛囊，用 S100A6 mRNA 的反义探针行原位杂交。在内根鞘的 Huxley 层和外根鞘最内层可见很强的信号，在髓质则很弱。C. 生长期毛囊中 S100A3 和 S100A6 mRNA 的表达示意图。这种分布类型在触须和体毛的毛囊中均存在（ORS：外根鞘；IM：最内层；HL：内根鞘 Henle 层；HX：内根鞘 Huxley 层；IC：内根鞘鞘小皮层；HC：毛小皮层；CO：毛干皮质层；M：毛干髓质层）。

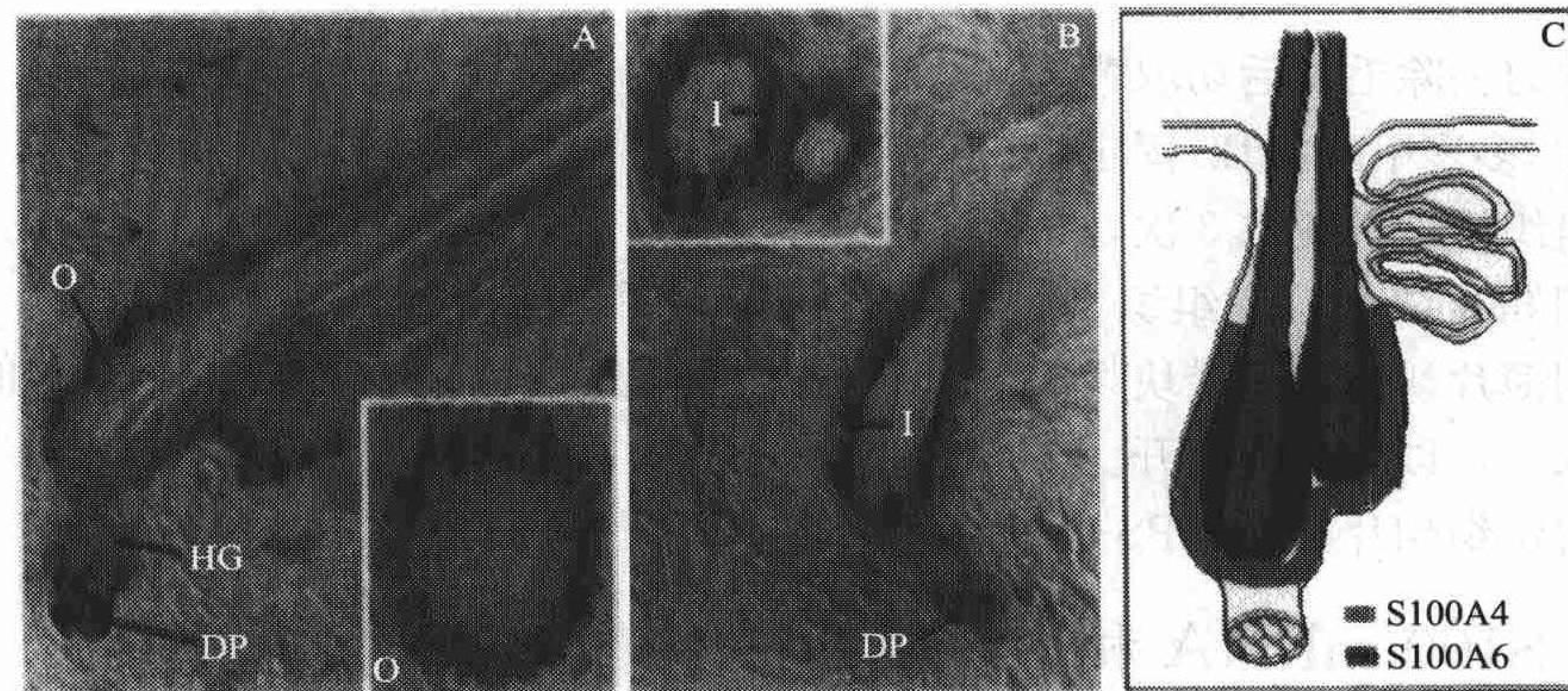


图 23.2 S100A4 和 S100A6 蛋白在休止期毛囊中的定位

8 周龄小鼠体毛的毛囊用抗 S100A4（A）和抗 S100A6（B）抗体行免疫组化染色。S100A4 蛋白位于上皮囊的外层（O），而 S100A6 蛋白则更多地分布于其内层（I）。在真皮的毛乳头（DP）都可见两种蛋白质染色，但在毛胚芽（HG）却没有，摘自参考文献 [6]。(C) S100A4 和 S100A6 蛋白在休止期毛囊中分布的示意图。

3.3.1 原位杂交

（1）二甲苯脱蜡［见注意事项（7）］，两次，每次 15 min。

（2）依次用 100%、100%、90%和 70%乙醇处理，每个浓度 5 min。

（3）PBS 洗涤，两次，每次 15 min。

（4）在 0.2 mol/L HCl 中孵育，20 min。

（5）蛋白酶 K/TE 缓冲液［20 μg/ml，预孵育 1 h，见注意事项（8）］37℃处理 10 min。

（6）PBS 冲洗，5 min。

（7）4%多聚甲醛/PBS 固定，20 min。

(8) 用 DEPC 处理过的 H_2O 冲洗，30 s。

(9) 甘氨酸/PBS（2 mg/ml）孵育，两次，15 min。

(10) 三氟乙酸/无水乙酸处理，10 min。

(11) 重复步骤（2），但所用乙醇的浓度顺序相反，每个浓度 5 min。

(12) 风干，用 DAKO 笔画出切片边界。

(13) 在杂交混合物中预杂交［每张载玻片 80 μl，见注意事项（9）］，45℃ 2 h。

(14) 将用于 S100 mRNA 的地高辛配基标记的 RNA 探针加热至 85℃，3 min。

(15) 用杂交混合物稀释探针（0.2 ng/μl）。

(16) 探针与切片杂交（每张切片 80 μl），45℃过夜。

(17) 5× SSC 漂洗 30 s，45℃。

(18) 2× SSC/50%甲酰胺孵育，30 min，45℃。

(19) 2× SSC 孵育 20 min，45℃。

(20) 0.2× SSC 孵育，两次，20 min，45℃。

(21) 用 0.3%Tween-20/马来酸盐缓冲液漂洗，5 min。

(22) 1.5%封闭试剂/10%绵羊血清/0.005%酵母 tRNA/马来母酸盐缓冲液，孵育 60 min。

(23) 与碱性磷酸酶标记的抗地高辛配基抗体（用前述封闭缓冲液 1000 倍稀释）孵育，30 min。

(24) 用 0.3%Tween-20/马来酸盐缓冲液漂洗，15 min。

(25) 马来酸盐缓冲液漂洗，15 min。

(26) 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH9.5）/0.1 mol/L NaCl/0.05 mol/L $MgCl_2$，漂洗 3 min。

(27) NBT/BCIP 储备液（用上述缓冲液稀释 20 倍）孵育 0.5～4 h。

(28) 自来水冲洗 10 min。

(29) 甘油封片。

3.3.2 免疫组织化学

(1) 按 3.3.1 的（1）～（3）步骤脱蜡和水化。

(2) 蛋白酶 K/TE 缓冲液（20 μg/ml）处理，37℃，10 min。

(3) PBS 漂洗 5 min。

(4) 4%多聚甲醛/PBS 固定，20 min。

(5) 含有 0.3%H_2O_2 的甲醇溶液处理，45 min。

(6) PBS 冲洗 5 min。

(7) 1.5%山羊血清/PBS 封闭，20 min。

(8) 与亲和纯化的兔抗 S100 抗体/PBS（1 μg/ml）孵育，45 min。

(9) 用 PBS 漂洗两次，5 min。

(10) 与生物素化的山羊抗兔 IgG/前述的封闭缓冲液（2.5 μg/ml）孵育，30 min。

(11) PBS 漂洗两次，5 min。

(12) 与亲和素-生物素化的辣根过氧化物酶复合物/PBS［见注意事项（10）］孵

育，45 min。

（13）PBS 漂洗两次，5 min。

（14）用 40 μg/ml 二氨基联苯胺/Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）/0.0004% H_2O_2 处理2～10 min。

（15）自来水冲洗。

（16）通过梯度乙醇脱水，最终在二甲苯中透明。

（17）用 Mount-Quick 快速封片剂封片。

3.4 BrdU 标记同时检测 S100 蛋白

通过分析增殖细胞的空间分布，我们可以清楚地将毛囊内的短暂扩增细胞区域和有丝分裂后分化细胞区域区分出来。同时检测增殖细胞与 S100 的表达，可明确表达 S100 蛋白的毛囊特定层细胞在固定样本的时候是否正处于增殖中（图 23.1A）。这部分内容为介绍在同一张组织切片上同时检测 S100 蛋白和 BrdU 脉冲标记增殖细胞的方法。

3.4.1 联合的原位杂交和 BrdU 免疫组织化学染色法

（1）根据 3.3.1 列出的方法对经 BrdU 处理过的动物（参考 3.2.2.）组织切片进行原位杂交。

（2）在原位杂交的最后显像步骤之后，将玻片放在蒸馏水中。

（3）用 2 mol/L HCl 在 37℃处理 1 h，以使核 DNA 部分变性。

（4）0.1 mol/L $Na_2B_4O_7$ 孵育 5 min。

（5）PBS 漂洗三次，5 min。

（6）1.5%兔血清/PBS 封闭，20 min。

（7）与单克隆抗 BrdU 抗体［PBS 稀释 1000 倍，见注意事项（11）］孵育 45 min。

（8）PBS 漂洗两次，5 min。

（9）生物素化的兔抗大鼠 IgG 抗体/前述的封闭缓冲液（2.5 μg/ml）孵育，30 min。

（10）PBS 漂洗两次，5 min。

（11）亲和素-生物素化的辣根过氧化物酶复合物/PBS［见注意事项（10）］，孵育 45 min。

（12）PBS 漂洗两次，5 min。

（13）用 40 μg/ml 二氨基联苯胺/Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）/0.0004% H_2O_2 处理 2～10 min。

（14）自来水冲洗。

（15）甘油封片。

3.4.2 S100 蛋白和 BrdU 的双免疫染色法

（1）根据 3.3.2 的步骤（1）～（6）进行切片的脱蜡、抗原修复、后固定、内源性酶的灭活。

（2）1.5%山羊血清/PBS 封闭，20 min。

(3) 兔抗 S100 抗体的抗血清/PBS（100 倍稀释）孵育，45 min。

(4) PBS 漂洗两次，5 min。

(5) 与生物素化的山羊抗兔 IgG 抗体/PBS（2.5 μg/ml）孵育，30 min。

(6) PBS 漂洗两次，5 min。

(7) 亲和素-生物素化的碱性磷酸酶复合物/PBS 孵育 [见注意事项（12）]，45 min。

(8) PBS 漂洗两次，5 min。

(9) 用 Vector 蓝碱性磷酸酶底物显色，30 min。

(10) 将玻片放入蒸馏水，然后按照 3.4.1 的步骤（3）～（15）进行 BrdU 免疫反应性检测。

4 注意事项

(1) 由公司来提供 DNA 与多肽合成的客户服务（如 Qiagen，www.qiagen.com）。无特殊病原体的饲养条件对生产高滴度多克隆抗血清是有利的，也可以通过公司为客户提供免疫接种服务。

(2) 如果需要大量的克隆，可以通过离心培养基得到沉淀的细胞，然后在 100 μl SOC 培养基中重悬细胞。

(3) Hopp 和 Woods[10] 推荐按照 6 肽均值来定标。

(4) 典型的 ELISA 滴度峰值出现在 3～4 次注射后。

(5) 两性离子缓冲剂（Tricine）-SDS-PAGE[11] 电泳能使各种 S100 蛋白（约 10 kDa）截然分开。

(6) 在毛囊的某些区域，mRNA 与蛋白质的分布是不同的。例如，休止期毛囊上皮囊的外层存在 S100A4 蛋白，但没有其 mRNA[6]。

(7) 脱蜡、抗原修复、后固定和漂洗等步骤都是在染色容器中进行的。

(8) 蛋白激酶 K 储存液（100 μl）加入 100 ml TE，37℃水浴孵育。

(9) 杂交步骤、抗体应用和染色步骤都在湿化盒中进行。

(10) 使用前，在 5 ml PBS 中加入 Elite ABC 试剂盒里提供的试剂 A（亲和素）和试剂 B（生物素化的辣根过氧化物酶）各 2 滴，静置 30 min 以便形成复合物。

(11) 对大鼠组织用小鼠抗 BrdU 抗体，对小鼠组织用大鼠抗 BrdU 抗体。

(12) 使用前，在 10 ml PBS 中加入 ABC-AP 试剂盒里提供的试剂 A（亲和素）和试剂 B（生物素化的碱性磷酸酶）各 2 滴，静置 30 min 以便形成复合物。

致　谢：著者要感谢 Kanebo 有限公司基础研究实验室以前的和现在的其他成员，正是他们为这些实验方法的发展作出了贡献。

（王亚洲 译　伍津津 校）

参考文献

[1] Heizmann, C. W., Fritz, G., and Schaer, B. W. (2002) S100 proteins: structure, function and

pathology. *Front. Biosci.* **7**, d1356—d1368.

[2] Kizawa, K., Uchiwa, H., and Murakami, U. (1996) Highly-expressed S100A3, a calciumbinding protein, in human hair cuticle. *Biochim. Biophys. Acta* **1312**, 94—98.

[3] Kizawa, K., Tsuchimoto, S., Hashimoto, K., and Uchiwa, H. (1998) Gene expression of mouse S100A3, a cysteine-rich calcium-binding protein, in developing hair follicle. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 879—886.

[4] Wood, L., Carter, D., Mills, M., Hatzenbuhler, N., and Vogeli, G. (1991) Expression of calcyclin, a calcium-binding protein, in the keratogeous region of growing hair follicle. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 383—387.

[5] Schmidt, M., Gillitzer, R., Toksoy, A., Brocker, E.-B., Rapp, U.R., Paus, R., et al. (2001) Selective expression of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 at distinct sites ofhair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 748—750.

[6] Ito, M. and Kizawa, K. (2001) Expression of calcium-binding S100 proteins A4 and A6 in Regions of the epithelial sac associated with the onset of hair follicle regeneration. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 956—963.

[7] Ito, M., Kizawa K., Toyoda, M., and Morohashi, M. (2002) Label-retaining cells residing in the bulge region are directed to cell death after plucking followed by healing from the surviving hair germ. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 1310—1316.

[8] Lin, M.-H., Leimeister, C., Gessler, M., and Kopan, R. (2000) Activation of the Notch pathway in the hair cortex leads to aberrant differentiation of the adjacent hair-shaft layers. *Development* **127**, 2421—2432.

[9] Posnett, D.N., McGrath, H., and Tam, J.P. (1988) A novel method for producing antipeptide antibodies: production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor β-chain. *J. Biol. Chem.* **263**, 1719—1725.

[10] Hopp, T.P. and Woods, K.R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3824—3828

[11] Schager, H., and von Jagow, G. (1989) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **40**, 91—99.

[12] Dry, F.W. (1926) The coat of the mouse (Mus musculus). *J. Genet.* **16**, 287—340.

[13] Chase, H.B., Rauch, H., and Smith, V.W. (1951) Critical stages of hair development and pigmentation in the mouse. *Physiol. Zool.* **24**, 1—8.

第24章 角质化细胞包膜的免疫电子显微镜分析和抗原修复

Akemi Ishida-Yamamoto

摘 要：本章讲述研究角质化细胞包膜的后包埋免疫电子显微镜方法。以人表皮组织样本为材料，进行冰冻固定而非化学固定，低温下冷冻替换，包埋于 Lowicryl K11M 树脂。免疫染色时，使用胶体金偶联的二抗。本章还介绍了用于掩盖抗原表位修复的方法。
关键词：免疫电子显微镜；后包埋法；角质化细胞包膜；角质形成细胞；外皮蛋白；兜甲蛋白；表位掩盖

1 导言

角质化细胞包膜（cornified cell envelope，CE）是一种高度不溶性的结构，它取代了分化中的角质形成细胞的质膜[1]。CE 由不同的交联前体蛋白组成，包括外皮蛋白（involucrin）和兜甲蛋白（loricrin）。在过去的几年里，我们开始了解 CE 的正常组装过程及其在皮肤疾病时的变化。本章将详细介绍用后固定免疫电镜研究 CE 蛋白定位的方法[2]。由于在 CE 组装或组织处理过程中，一些 CE 蛋白的表位被掩盖，本章也提供了抗原修复的方法[3,4]。所有的实验方案都是针对人的皮肤标本而建立的。

2 材料

2.1 免疫电镜所用的抗体

（1）兔多克隆抗兜甲蛋白抗体（AF62；BAbCO，Richmond，CA；cat. no. PRB-145P）。

（2）小鼠单克隆抗外皮蛋白抗体（SY5；NeoMarkers，Fremount，CA；cat. no. MS-126-P）。

（3）兔多克隆抗外皮蛋白抗体（BT-601；Biomedical Technologies，Stoughton，MA；cat. no. BT-601）。

2.2 试剂

2.2.1 树脂包埋组织样本的制备

（1）免疫电镜包埋树脂 Lowicryl K11M（TAAB Laboratories，UK；cat. no. L016）。

(2) 镍 150-格网（VECO® Plain Nickel Grids，Ernest F. Fullam，Inc. NY；cat. no. 26121)。

(3) 聚乙烯醇缩甲醛（Formvar)：3% Formvar 溶液（LADD Research Industries；cat. no. 12065)，用 1，2-二氯乙烷（1，2-dichloroethane）稀释到 0.3%，室温可保存 1 个月。

2.2.2 免疫电镜

(1) 鱼明胶（Amersham Biosciences，Buckinghamshire，UK；cat. no. RPN416)。

(2) 预孵育缓冲液：1%牛血清白蛋白（BSA)，5%正常山羊血清（NGS)，0.1% 鱼明胶，0.02% 叠氮钠（NaN_3）/磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）pH 7.4。

(3) 第一孵育缓冲液：1% BSA，1% NGS，0.1%鱼明胶，0.02% 叠氮钠/PBS。

(4) Tris-HCl 缓冲的生理盐水，pH 8.2（TBS)：0.242 g Tris，0.13 g NaN_3，0.9 g NaCl；用 0.1 mol/L HCl 调节 pH 到 8.2 后，加水至 100 ml 体积。

(5) 第二孵育缓冲液：含有 1% BSA、1% NGS、0.1%鱼明胶的 TBS。

(6) 5 nm 胶体金偶联的山羊抗兔 IgG 抗体（Amersham Biosciences，Buckinghamshire，UK；cat. no. RPN420)。

(7) 10 nm 胶体金偶联的山羊抗兔 IgG 抗体（Amersham Biosciences；cat. no. RPN421)。

(8) 5 nm 胶体金偶联的山羊抗小鼠 IgG 抗体（Amersham Biosciences；cat. no. RPN424)。

(9) 10 nm 胶体金偶联的山羊抗小鼠 IgG 抗体（Amersham Biosciences；cat. no. RPN425)。

2.2.3 抗原修复

(1) 蛋白酶 K（DAKO，Carpinteria，CA；cat. no. S3020)：50 mmol/L，用 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液配制，−30℃可保存 3 个月。

(2) 胰蛋白酶（Difco，Detroit，MI；cat. no. 0152-13-1)：PBS 配制成 0.25%，−30℃保存。

2.3 用于冰冻固定和冷冻置换的设备和冻存管

(1) Reichert KF80 冰冻固定仪（Leica，Wien，Austria)。

(2) 低温冻存管（Cryogenic vial，Nalge Company，Rochester，NY；cat. no. 5000-0020)。

(3) Reichert AFS 自动冷冻置换系统（Leica)。

3 方法

3.1 后包埋免疫电镜的组织制备

本节讲述的是后包埋免疫电镜制备组织样本的方法。使用冰冻固定可以固化生物样

本中的所有成分，而不需任何化学固定过程，这就避免了对敏感和不稳定的抗原位点的损伤作用。然后，用冷冻置换方法，样本中的冰在低温下被有机溶剂溶解和替换，这使我们能够避免在较高温度下加工树脂可能引起的蛋白质变性。

3.1.1 冰冻固定

（1）活检或手术取得的皮肤组织标本应立即放入冰冷的15%甘油/PBS内浸泡1 h。标本要切成小于1 mm^3 的小块。

（2）用镊子将一个标本置于空的铜载网（VECO）上，并进行封固。

（3）快速投入到冰冻固定仪中的－190℃的液态丙烷中。

（4）置于冻存管内，保存于液氮中。

3.1.2 冷冻置换

（1）取一底部带网筛的塑料胶囊并盛有置换液（甲醇），然后放在－80℃自动冷冻置换系统的置换室内。将冰冻固定的组织标本转移到该塑料胶囊里。

（2）持续置换44 h，每天更换置换液两次。

3.1.3 低温包埋

（1）按5℃/h升高标本的温度至－60℃，在暗处开始用包埋剂浸润标本。

（2）准备新鲜的包埋剂Lowicry K11M。

（3）通过增加甲醇中Lowicryl的浓度来置换标本里的置换液。Lowicryl K11M/甲醇（$V:V$）的浓度如下：①1∶2，1 h；②1∶1，1 h；③2∶1，1 h；④纯Lowicryl K11M，1 h；⑤纯Lowcryl K11M，过夜；⑥把新鲜Lowicryl K11M注入塑料模具里包埋标本。

（4）在－60℃用紫外线照射48 h，引发聚合反应，同时温度按5℃/h升高至20℃，此后继续聚合48 h。

3.2 免疫染色

本节讲述后包埋免疫电镜的切片制作方法和免疫染色方法。

3.2.1 切片操作

（1）从塑料模具中取下Lowicryl K11M包埋的标本。

（2）用超微切片机切取100 nm厚的切片，将切片收集在Formvar包被的镍网上[见注意事项（1）]。

（3）用滤纸吸干，空气中干燥。

3.2.2 免疫染色操作

在滴于石蜡封口膜（Parafilm，American Natinal Can，Chicago，IL）的数滴溶液中进行免疫染色[阴性对照实验和双标记染色，分别见注意事项（2）和（3）]。

（1）将载有标本的网筛置于一滴预孵育液中孵育，室温15 min。

(2) 用第一孵育缓冲液稀释的一抗溶液（抗兜甲蛋白抗体 AF62，1∶500 稀释；抗外皮蛋白抗体 SY5，1∶100 稀释；抗外皮蛋白抗体 BT-601，1∶5 稀释），将标本切片转移至一滴一抗中，37℃孵育 1 h。

(3) 于数滴第一孵育缓冲液中孵育，室温 5 min，两次。

(4) 于数滴第二孵育缓冲液中孵育，室温 5 min，两次。

(5) 于一滴相应的胶体金偶联的二抗溶液中孵育（金颗粒大小为 5 nm 或 10 nm，用第二孵育缓冲液按 1∶10 稀释），37℃ 1 h。

(6) 于数滴第二孵育缓冲液中孵育，室温 5 min，两次。

(7) 于数滴蒸馏水中孵育，室温 5 min，两次。蒸馏水流水淋洗。

(8) 用滤纸吸干，于薄膜上风干。

(9) 为增加反差，切片用含有 1.5%乙酸双氧铀（uranyl acetate）的甲醇处理 3 min。

(10) 50%甲醇/蒸馏水淋洗。

(11) 蒸馏水淋洗。

(12) 用滤纸吸干，于薄膜上风干。

3.3 抗原修复

Lowicryl K11M 包埋皮肤组织的超薄切片在下列溶液中孵育：含有 0.4 mg/ml 蛋白酶 K 的 Tris-HCl 缓冲液，pH 7.4，室温 30 s～5 min；或含有 0.25%胰蛋白酶的 PBS，pH 7.4，37℃孵育 15～60 min。用缓冲液淋洗（分别是 Tris-HCl 缓冲液 pH 7.4 和 PBS pH 7.4）。然后如前述的方法进行免疫染色。

4 注意事项

(1) Lowicryl K11M 是一种亲水树脂，因此，在切片时要注意组织块表面不要弄湿，可以在刀槽中以低水位来达到此目的。

(2) 阴性对照包括仅与二抗的孵育，以及与抗表皮不相关抗原的一抗的孵育。

(3) 对于双标，用一种一抗染色和 5 nm 胶体金偶联的二抗标记，然后用另一种其他动物产生的一抗和 10 nm 胶体金偶联的二抗标记。

致 谢：如前所述，本方法的建立受日本教育、文化、体育、科学和技术部，以及健康、劳动和福利部基金的资助。

（孙慧勤 邹仲敏 译 粟永萍 校）

参考文献

[1] Ishida-Yamamoto, A. and Iizuka, H. (1998) Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp. Dermatol.* **7**, 1—10.

[2] Ishida-Yamamoto, A., Eady, R. A. J., Watt, F. M., Roop, D. R., Hohl, D., and Iizuka, H. (1996)

Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelope formation in normal and psoriatic epidermis. *J. Histochem. Cytochem.* **44**, 167—175.

[3] Ishida-Yamamoto, A., Tanaka, H., Nakane, H., Takahashi, H., and Iizuka, H. (1999) Antigen retrieval of loricrin epitopes at desmosomal areas of cornified cell envelopes: an immunoelectron microscopic analysis. *Exp. Dermatol.* **8**, 402—406.

[4] Ishida-Yamamoto, A., Kato, H., Kiyama, H., Armstrong, D. K. B., Munro, C. S., Eady, R. A. J., et al. (2000) Mutant loricrin is not crosslinked into the cornified cell envelope but is translocated into the nucleus in loricrin keratoderma. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 1088—1094.

第四部分　表皮功能分析的方法及途径

第25章　用免疫化学方法进行人工皮肤的细胞动力学分析

Andrea Casasco，Antonia Icaro Cornaglia，Federica Riva，
Marco Casasco，Alberto Calligaro

摘　要：细胞动力学研究为在体和离体的组织发生提供了重要的信息。据此，人们已经鉴定和制备了一些细胞周期相关抗原的特异性抗体，使得用免疫化学方法研究细胞动力学成为可能。近来培养技术的发展，使人们可以在体外制备人体皮肤的类似物。这里我们详细讲述用免疫组织化学和流式细胞术，在人工皮肤模型上研究表皮细胞动力的实际操作，这两种技术的结合应用可以准确检测组织生长的部位和定量分析细胞的生长。此外，同步分析细胞分化标志和增殖抗原有益于了解调控组织生长与发育的分子机制。

关键词：人工皮；生物技术；细胞周期；免疫组织化学；流式细胞术；溴脱氧尿嘧啶；增殖细胞核抗原；Ki-67 抗原；细胞周期相关抗原；表皮干细胞

1　导言

干细胞在培养技术中的应用为体外器官重建打下了基础，特别是皮肤角质形成细胞的培养使制备类似天然表皮的表皮细胞层成为可能[1]；进而，表皮层与由结缔组织构成的真皮类似物相结合，形成完整的皮肤结构[2~6]。表皮和真皮干细胞可以从不同来源中分离[7]；再者，把黑色素细胞、郎格汉斯（Langerhans）细胞、血管和毛发引入工程化皮肤模型也是可行的[8~11]。与细胞动力学相关的信息对于阐明如何在体外能够进行组织重建十分重要。

据此，针对细胞周期相关抗原的单克隆抗体的产生，为使用免疫化学研究组织的细胞动力学提供了基础。可以利用每一个在细胞周期不同阶段特异表达的细胞抗原，通过使用免疫化学方法来监视一个细胞在细胞周期中所处的位置[12,13]。免疫细胞化学可以准确定位组织内的增殖细胞，而流式细胞术可以显示免疫反应性细胞在细胞周期内的准确位置并量化生长分数。此外，用双重免疫化学染色同时检测细胞周期相关抗原和分化标志，可以用于揭示调控组织生长动力学（例如，与增殖抗原共表达的受体或黏附分子）的分子机制。

在此，我们详细介绍在人工皮肤模型上曾使用过的、以免疫组织化学和流式细胞术研究细胞动力学的实际操作[14,15]。

2　材料

2.1　组织和抗原研究

（1）人工皮肤[4,5]：人皮肤类似物（HSE）Apligraf（Organogenesis Inc.，MA），

4℃保存。

（2）抗 Ki-67 抗原的单克隆抗体，克隆 MIB-1（BioGenex，CA；cat. no. AM129）。

（3）抗溴脱氧尿嘧啶（BrdU）抗原的单克隆抗体，克隆 B44（Becton Dickinson，CA；cat. no. 7580）。

（4）抗 BrdU 抗原的单克隆抗体，克隆 BU-1。该即用型试剂带有产生单链脱氧核糖核酸（DNA）的核酸酶（Amersham，England；cat. no. RPN202）。

（5）抗增殖细胞核抗原（PCNA）的单克隆抗体，克隆 PC-10（Novocastra Laboratories，England；cat. no. NCL-PCNA）。

（6）用多聚赖氨酸包被玻片：在 10 ml 水中溶解 10 mg 多聚赖氨酸（poly-L-lysine）配制成 0.1%的溶液。分装成每管 0.5～1 ml，－20℃保存；使用时，取一管完全溶解后混匀。没有用完的溶液可以重放回冰箱中保存。在干净玻片的一端滴一小滴溶液，将多聚赖氨酸溶液平摊成覆盖玻片表面的均匀的薄膜；薄膜很快干燥后，玻片便可使用。由于薄膜并不可见，需标记出多聚赖氨酸包被的那面。如果溶液不能摊成薄膜而呈小珠滴状，说明玻片不够干净。可以将此玻片浸泡在酸性乙醇（acid-alcohol）中过夜，然后用乙醇漂洗。

2.2 免疫组织化学分析

（1）石蜡块，凝点 56℃（BDH，England；cat. no. 361077E）。

（2）胃蛋白酶 A，来自猪胃黏膜（Sigma-Aldrich，Germany；cat. no. P7125）。

（3）正常山羊血清（NGS）（Sigma-Aldrich，Germany；cat. no. G9023）。

（4）牛血清白蛋白（BSA）（Sigma-Aldrich，Germany；cat. no. A9647）。

（5）生物素化抗体（生物素化的免疫球蛋白）（BioGenex；cat. no. HK336-5R）。

（6）辣根过氧化物酶标记的链亲和素（super sensitive kit，BioGenex；cat. no. HK320-UK）。

（7）3，3′-二氨基联苯胺（DAB；DAB 溶液 Biogenex；cat. no. HK153-5K）。

（8）磷酸盐缓冲盐溶液（PBS），pH 7.4。溶液 A：5.52 g $KH_2PO_4 \cdot H_2O$ 溶解于 200 ml 水中。溶液 B：28.48 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 溶解于 800 ml 水中。使用时，将溶液 A 和溶液 B 混合（1∶4）配成 0.2 mol/L 缓冲液。用水按 1∶1 稀释成 0.1 mol/L 缓冲液，检查 pH。

（9）0.05 mol/L Tris 缓冲的生理盐水（TBS），pH 7.4：6.07 g Tris 碱和 8.7 g NaCl 溶解于 900 ml 去离子水中，加浓盐酸（12～14 ml）调节至 pH 7.4，加水至 1 L。

（10）0.05 mol/L Tris-HCl，pH 7.4（底物缓冲液）：6.61 g Tris-HCl，0.97 g Tris 碱溶解于 900 ml 去离子水，用 1 mol/L HCl 调 pH 后，加水定容至 1 L。

（11）0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液，pH 6.0：1.9 g 枸橼酸溶于 900 ml 水，加 2 mol/L NaOH 调节至 pH 6.0，加水定容至 1 L。缓冲液可以在室温保存数日。

（12）一抗和生物素化抗体稀释液：0.1 g BSA，0.01 g NaN_3 溶解于 10 ml TBS，pH 7.4。

（13）链亲和素-过氧化物酶标记物的稀释液：0.1 g BSA 和 0.001 g 硫柳汞（thimerosal）两种粉末溶于 10 ml TBS，pH 7.4［见注意事项（1）］。

（14）DAB溶液：1 mg DAB溶于2 ml底物缓冲液配成终浓度为0.05%的DAB溶液。临用前加10 μl 3% H_2O_2（终浓度为0.01%～0.02%）。每次在使用前10 min配制新鲜溶液［见注意事项（2）］。

（15）0.1 mol/L PBS（pH 7.4）缓冲的多聚甲醛：8 g多聚甲醛溶于100 ml水，搅拌，加热到55℃。加入1 mol/L NaOH，每次一滴，直到溶液变清亮。室温冷却，加100 ml PBS（0.2 mol/L，pH 7.4）至终浓度为0.1 mol/L。

2.3 流式细胞术分析

（1）1× III型胰蛋白酶（Eurobio，France；cat. no. CEZ DA00-0U）。

（2）0.1% NP-40（Calbiochem，CA；cat. no. 492015）。

（3）碘化丙啶（Propidium iodide，50 g/ml；Calbiochem，CA；cat. no. 537059）。

（4）无DNA酶的1A型RNA酶（50 Kunitz U/ml；Sigma-Aldrich，Germany；cat. no. R7397）。

（5）Triton X-100（BDH，Pole，England；cat. no. 30632）。

（6）BSA（Sigma-Aldrich，Germany；cat. no. A9647）。

（7）异硫氰酸荧光素（FITC）标记的山羊抗小鼠IgG（Sigma-Aldrich，Germany；cat. no. F5387）。

（8）小鼠同种型对照抗体IgG2a，Kappa（UPC-10；Sigma-Aldrich，Germany；cat. no. M9144）。

（9）0.01 mol/L PBS，pH 7.4：8.7 g NaCl、0.272 g KH_2PO_3、1.136 g Na_2HPO_3 溶解于水，加水至1 L，检查pH。

（10）漂洗缓冲液和抗体稀释液（PTA）：10 μl Triton X-100和0.1 g BSA溶于10 ml PBS。每次配制新鲜溶液。

（11）PBS（pH 7.4）缓冲液配制的4%多聚甲醛：8 g多聚甲醛溶于100 ml水，搅拌，加热到55℃。加入1 mol/L NaOH，每次一滴，直到溶液变清亮。室温冷却，加100 ml PBS（0.2 mol/L，pH 7.4）。

2.4 仪器

（1）FACStar细胞分选仪（Becton Dickinson，CA）。

（2）Partec PAS V细胞分析仪（Basel，Switzerland）。

（3）光学显微镜（Axiophot，Zeiss，Germany）。

3 方法

3.1 BrdU掺入

（1）活HSE在含200 μmol/L BrdU的5 ml培养基中孵育2 h，标记S期细胞。

（2）用0.1 mol/L PBS洗涤，随后固定细胞。

3.2 免疫组织化学检测细胞周期相关抗原

本节讲述用免疫组织化学方法检测增殖细胞典型蛋白的表达[16~21]。

3.2.1 标本准备

(1) 用固定液(4%多聚甲醛,PBS缓冲液配制)固定皮肤标本(5 mm × 5 mm)6 h。

(2) 用TBS洗三次,共15 min。然后开始通过梯度乙醇脱水:70%乙醇2 h,85%乙醇2 h,100%乙醇2 h,二甲苯10 min。

(3) 于石蜡中包埋标本。

(4) 切5~10 μm厚的石蜡切片。切片漂浮于温水(不烫),用多聚赖氨酸包被的玻片捞片。37℃干燥数小时。

(5) 换两次二甲苯脱蜡,经过梯度乙醇直至水。

(6) 阻断内源性过氧化物酶:用0.3% H_2O_2 水溶液处理30 min(短一点时间也可能足够)。

(7) 把玻片置于TBS中,接下来按间接免疫过氧化物酶操作进行免疫染色[参考文献[22]和[23];见注意事项(3)]。

3.2.2 石蜡切片的抗BrdU、PCNA和Ki-67单克隆抗体染色操作

3.2.2.1 抗BrdU抗体,克隆BU-1

(1) 切片浸入含0.5%胃蛋白酶的0.01 mol/L HCl溶液,37℃孵育30 min。

(2) 用自来水洗5 min,TBS洗5 min。

(3) 在湿盒中用NGS(以TBS按1∶20稀释)处理30 min,以减少非特异背景染色,然后从切片除去多余血清。

(4) 切片与一抗孵育(用特定缓冲液按1∶2稀释),湿盒中4℃过夜,TBS漂洗10 min,共三次。

(5) 切片与1∶50稀释的生物素化抗体(生物素化的抗免疫球蛋白)室温孵育20 min,TBS漂洗10 min,共三次。

(6) 切片与过氧化物酶标记的链亲和素(用特定缓冲液按1∶50稀释)室温孵育20 min,TBS漂洗10 min,共三次。

(7) 加足量的DAB溶液完全覆盖切片,孵育3~5 min。

(8) 用TBS漂洗10 min,苏木精复染切片。

(9) 用自来水漂洗玻片10 min,经过梯度乙醇和二甲苯脱水透明。

(10) 用持久介质封片。

3.2.2.2 Ki-67

(1) 将玻片置于塑料玻片架里,完全浸入0.01 mol/L枸橼酸缓冲液。

(2) 用微波炉750 W处理5 min(缓冲液必须沸腾)以修复抗原[24]。

(3) 待缓冲液冷却,直到玻片移出后不会因干燥而产生缓冲盐类的沉积。然后,TBS缓冲液漂洗5 min,两次。

(4) 在湿盒中用 NGS（以 TBS 按 1∶20 稀释）处理 30 min，以减少非特异背景染色，然后从切片中除去多余血清。

(5) 切片与小鼠抗 Ki-67 抗原单克隆抗体孵育（用特定缓冲液按 1∶50 稀释），湿盒中 4℃过夜，TBS 漂洗 10 min，共三次。

(6) 切片与 1∶50 稀释的生物素化抗体（生物素化的抗免疫球蛋白）室温孵育 20 min。

(7) TBS 漂洗 10 min，共三次。

(8) 切片与 1∶50 稀释的辣根过氧化物酶标记的链亲和素室温孵育20 min，TBS 漂洗 10 min，共三次。

(9) 加足量的 DAB 溶液完全覆盖切片，孵育 3～5 min。

(10) 用 TBS 漂洗 10 min，苏木精复染切片。

(11) 用自来水淋洗玻片 10 min。

(12) 经过梯度乙醇和二甲苯脱水透明。

(13) 用持久介质封片。

3.2.2.3 PCNA

(1) 在湿盒中用 NGS（以 TBS 按 1∶20 稀释）处理 30 min，以减少非特异背景染色。

(2) 从切片中除去多余血清，将切片与小鼠抗 PCNA 单克隆抗体孵育（用特定缓冲液按 1∶200 稀释），湿盒中 4℃过夜。

(3) TBS 漂洗 10 min，共三次。

(4) 与 1∶50 稀释的生物素化抗体（生物素化的抗免疫球蛋白）室温孵育 20 min。TBS 漂洗 10 min，共三次。

(5) 切片与 1∶50 稀释的辣根过氧化物酶标记的链亲和素室温孵育20 min，TBS 漂洗 10 min，共三次。

(6) 加足量的 DAB 溶液完全覆盖切片，孵育 3～5 min。

(7) 用 TBS 漂洗 10 min，苏木精复染切片。

(8) 用自来水淋洗玻片 10 min，经过梯度乙醇和二甲苯脱水透明。

(9) 用持久介质封片。

3.2.2.4 对照

为检测某一组织标本免疫染色的特异性，必须要设立阴性对照。阴性对照可以用非免疫血清或抗体稀释液替代一抗血清[25]，其他的条件必须与检测标本一致。阳性对照也是必需的，可以用已知表达被检测抗原的组织作为阳性对照。

3.3 流式细胞术分选的染色操作[26]

(1) 修剪 HSE 标本至小块。

(2) 80%乙醇 4℃浸泡处理 10 min。

(3) 用含 Triton X-100（0.1% 终浓度）的 PBS 漂洗 15 min。

3.3.1 碘化丙啶 DNA 染色

(1) 以 400 *g* 离心细胞悬液，细胞沉淀用含 50 μg/ml 碘化丙啶、0.1% NP-40 和

1A 型核糖核酸酶（50 Kunitz U/ml）的 PBS 溶液室温染色 30 min。

（2）标本可在 4℃保存 24 h。

（3）在流式细胞术检测前，过滤细胞以除去凝集团块。

3.3.2 流式细胞术的双参数分析（间接免疫荧光操作，图 25.1）

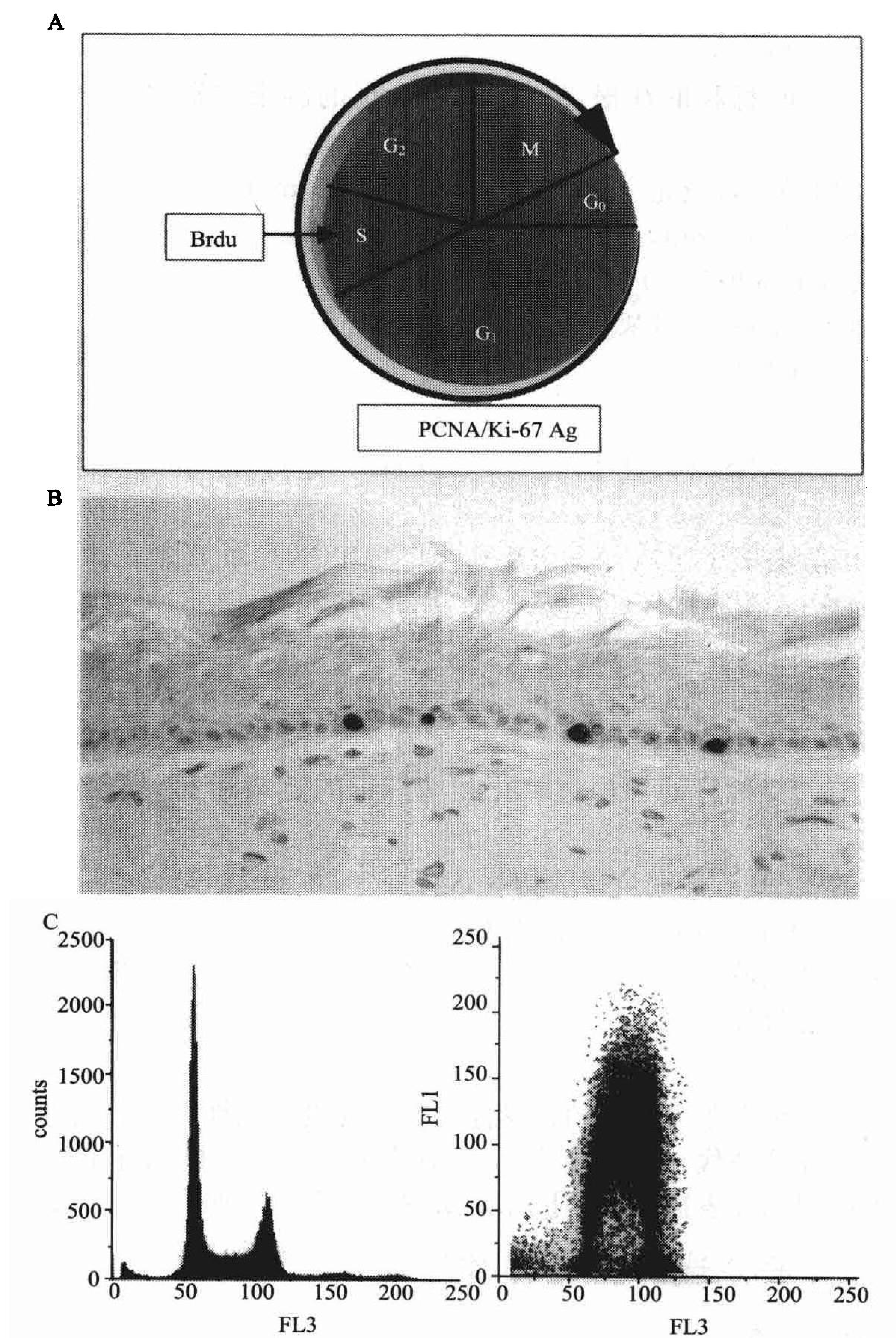


图 25.1　A. 某些细胞周期相关抗原表达的时间特性。细胞周期的 G_1 期、S 期和 G_2-M 期细胞群表达 PCNA 和 Ki-67 抗原（Ag），而 BrdU 免疫染色仅限于 S 期细胞。B. 人皮肤类似物内增殖细胞的免疫组织化学鉴定。Ki-67 抗原表达于 G_1 期、S 期和 G_2-M 期细胞。在表皮内，一些基底细胞核呈免疫染色阳性。放大倍数 400×。C. S 期细胞的流式细胞术分析。该图显示 DNA 含量（左）和 BrdU 免疫荧光与 DNA 含量的测定结果（右）。

3.3.2.1 BrdU 流式细胞术分析

（1）为检测 BrdU，离心细胞悬液（400 *g*），用 1 ml 2 mol/L HCl 室温处理细胞沉淀［（1～2）$\times 10^6$ 个细胞］30 min，变性 DNA。

（2）用1 ml 0.1 mol/L 四硼酸钠（sodium tetraborate）中和 15 min，室温 1200 r/min离心 3 min。

（3）PBS 漂洗 10 min，离心，细胞沉淀用 PTA 处理 30 min 以减少非特异背景染色。

（4）400 *g* 离心，室温 3 min；细胞沉淀与抗 BrdU 抗体 B44 室温孵育 30 min。抗体用含 0.5% NGS 的 PBS 按 1∶10 稀释。每 10 min 摇动标本管一次，以防沉淀。

（5）每管中加入 1 ml PTA，400 *g* 离心，室温 3 min，然后弃上清，用 PTA 漂洗沉淀 10 min，两次。

（6）细胞与 FITC 偶联的山羊抗小鼠二抗（用 PBS 按 1∶100 稀释）孵育 30 min，每 10 min 摇动标本管一次，以防沉淀。

（7）每管中加入 1 ml PTA，400 *g* 离心，室温 3 min，然后弃上清，用 PTA 漂洗沉淀 10 min，两次。

（8）400 *g* 离心，室温 3 min，细胞沉淀与含有 5 μg/ml 碘化丙啶、0.1% NP-40 和 1A 型 RNA 酶（50 Kunitz U/ml）的 PBS 孵育 30 min，染色 DNA。

（9）标本可在 4℃保存约 24 h。

（10）流式细胞术检测前，用滤器过滤细胞以除去凝集团块。

3.3.2.2 Ki-67 和 PCNA 的流式细胞术分析

（1）PBS 漂洗 10 min，400 *g* 离心。

（2）细胞沉淀用 PTA 处理 30 min 以减少非特异背景染色，400 *g* 离心，室温 3 min。

（3）细胞沉淀与一抗（Ki-67 或 PC-10，用 100 μl PTA 按 1∶100 稀释）室温孵育 1 h，每一标本管持续摇动。

（4）每管中加入 1 ml PTA，400 *g* 离心，室温 3 min，然后弃上清，用 PTA 漂洗沉淀 10 min，两次。

（5）弃上清，用 PTA 漂洗细胞沉淀 10 min，两次。

（6）细胞与 FITC 偶联的羊抗鼠二抗（用 100 μl PBS 按 1∶100 稀释）孵育 30 min，保持摇动每一标本管。

（7）每管中加入 1 ml PTA，400 *g* 离心，室温 3 min，然后弃上清，用 1 ml PTA 漂洗沉淀 10 min。

（8）400 *g* 离心，室温 3 min。细胞沉淀与含有 6 μg/ml 碘化丙啶、0.1% NP-40 和 1A 型 RNA 酶（50 Kunitz U/ml）的 1 ml PBS 孵育，室温染色 DNA 30 min。

（9）为检测标本，染色后室温至少等待 30 min 或 4℃过夜约 24 h。检测前，用滤器过滤细胞以除去凝集团块。

3.3.2.3 对照

为了用阴性对照来评价单克隆抗体的非特异结合，细胞与一个不相关同型抗体的一抗孵育，然后再与 FITC 偶联的二抗孵育。

3.4 免疫组织化学数据的量化评价

用常规光学显微镜观察细胞周期相关抗原的免疫标记细胞。至少要有两个独力的观察人员（AC，AIC），依据免疫反应细胞的数量对组织切片进行记分。BrdU、Ki-67 抗原和 PCNA 标记指数（如标记细胞的百分数）可以通过计数不同样本（$n = 5$）的三张不同切片中的免疫反应细胞来评价。在不同的组织区域，即表皮类似物的基底层、表皮和真皮中，评价标记指数（±标准差）[14,15]。

3.5 流式细胞术数据的量化评价［见注意事项（4）］

3.5.1 单参数 DNA 测定

（1）对于单参数 DNA 测定，每个标本用流式细胞仪分析至少 10 000 个细胞。

（2）用频率直方图显示数据，即细胞 DNA 含量测定值与总细胞数。按此方式可以知道处于细胞周期 G_1、S 和 G_2-M 期的细胞数，测定 S 期细胞的生长分数。

（3）与阴性对照比较结果。

3.5.2 双参数的分析

（1）用流式细胞仪分析，每一标本检测 10^4 个细胞。

（2）用 FACStar 细胞分选仪的双参数流式细胞术分析 BrdU（或 PCNA 或 Ki-67）掺入和细胞核 DNA 含量（分别为 FITC-绿色荧光与碘化丙啶-红色荧光）。

（3）通过根据细胞的 DNA 含量值（如所测定的 PI 荧光）对细胞进行分群，评价 BrdU（或 PCNA 或 Ki-67）免疫染色在细胞周期各期的荧光强度信号。

（4）使用仪器提供的软件程序（Consort 30 software）进行电子分群，排除双体细胞。

（5）用计算机系统运行的软件程序采集数据，用双参数等高密度图显示结果。该图可以显示在细胞周期的不同时期（G_1、S、G_2-M 期）内，与某一特异蛋白相关的免疫荧光的细胞周期分布。

4 注意事项

（1）由于叠氮钠抑制过氧化物酶活性，不推荐用做防腐剂。

（2）**小心**：DAB 被归类于潜在致癌剂，接触后能引起皮肤刺激症状。

（3）TBS 或甲醇可以代替水来稀释 H_2O_2。甲醇本身是过氧化物酶的抑制剂，可以与高达 3%的 H_2O_2 联合应用，持久抑制酶的活性。

（4）可以用 FACStar 细胞分选仪（Becton Dickinson，CA）或 Partec PAS V（Basel，Switzerland）分析细胞。然而，其他的流式细胞仪（如 Epics XL，Coulter，或者 FACScan，Becton Dickinson）也可以使用。所有的仪器都配有调至 488 nm 的氩气激光用于荧光的激发。每一设备带有用于双体细胞的电子修正。细胞周期每一期的细胞百分数由每一仪器商提供的软件完成统计分析。

致　谢：我们感谢 Giuliano Mazzini 博士（C. N. R.，Pavia）和 Aurora Farina 夫人（Pavia 大学）的有益讨论和有价值的技术帮助。该研究受 Pavia 大学基金资助（F. A. R.）。

（邹仲敏　孙慧勤 译　粟永萍 校）

参考文献

[1] Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331—344.

[2] Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J., and Nakatsuji, T. (1981) Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* **211**, 1052—1054.

[3] Asselineau, D., Bernard, B. A., Bailly, C., and Darmon, M. (1986) Three-dimensional culture of human keratinocytes on a dermal equivalent as a model system to study environmental modulation of epidermal physiology in vitro: effect of air-exposure. *Br. J. Dermatol.* **31**, 126—127.

[4] Parenteau, N. L., Nolte, C. M., Bilbo, P., Rosenberg, M., Wilkins, L. M., Johnson, E. W., et al. (1991) Epidermis generated in vitro: pratical considerations and applications. *J. Cell Biochem.* **45**, 245—251.

[5] Parenteau, N. L., Bilbo, P., Nolte, C. J., Mason, V. S., and Rosenberg, M. (1992) The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology* **9**, 163—171.

[6] Zacchi, V., Soranzo, C., Cortivo, R., Radice, M., Brun, P., and Abatangelo, G. (1998) In vitro engineering of human skin-like tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* **40**, 187—194.

[7] Eaglstein, W. H. and Falanga, V. (1997) Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin. Therapeutics* **19**, 894—905.

[8] De Luca, M., Franzi, A. T., D'Anna, F., Zicca, A., Albanese, E., Bondanza, S., et al. (1988) Coculture of human keratinocytes and melanocytes: differentiated melanocytes are physiologically organized in the basal layer of the cultured epithelium. *Eur. J. Cell Biol.* **46**, 176 180.

[9] Regnier, M., Staquet, M. J., Schmitt, D., and Schmidt, R. (1997) Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 510 -512.

[10] Black, A. F., Berthod, F., L'Heureux, N., Germain, L., and Auger, F. A. (1998) In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J.* **12**, 1331 -1340.

[11] Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A., and Germain, L. (1999) Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **35**, 318—326.

[12] Prosperi, E., Stivala, L. A., Scovassi, A. I., and Bianchi, L. (1997) Cyclins: relevance of subcellular localization in cell cycle control. *Eur. J. Histochem.* **41**, 161—168.

[13] Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelt, B., and Traganos, F. (1996) Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* **25**, 1 13.

[14] Casasco, A., Casasco, M., Icaro Cornaglia, A., Zerbinati, N., Mazzini, G., and Calligaro, A. (2001) Cell kinetics in a model of artificial skin. An immunohistochemical and flow cytometric analysis. *Eur. J. Histochem.* **45**, 125—130.

[15] Casasco, A., Casasco, M., Zerbinati, N., Icaro Cornaglia, A., and Calligaro, A. (2001) Cell proliferation and differentiation in a model of human skin equivalent. *Anat. Rec.* **264**, 261—272.

[16] Gratzner, H. G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**, 474—475.

[17] Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., and Stein, H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* **133**, 1710—1715.

[18] De Fazio, A., Leary, J. A., Hedley, D. W., and Tattersall, M. H. N. (1987) Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 571—577.

[19] McCormick, D., Chong, H., Datta, C., and Hall, P. A. (1993) Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* **22**, 355—360.

[20] Casasco, A., Giordano, M., Danova, M., Casasco, M., Icaro Cornaglia, A., and Calligaro, A. (1993) PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. *Histochemistry* **99**, 191—199.

[21] Casasco, A., Casasco, M., and Calligaro, A. (1997) Microscopical immunodetection of cell proliferation antigens. *Microsc. Anal.* **48**, 25—27.

[22] Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 577—580.

[23] Polak, J. M. and Van Noorden, S. (1986) *Immunocytochemistry, Modern Methods and Applications*, 2nd ed., Butterworth Heinemann, Oxford (originally John Wright and Sons, Bristol), UK.

[24] Shi, S. R., Key, M. E., and Kalra, K. L. (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffinembedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue section. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 741—748.

[25] Polak, J. M. and Van Noorden, S. (1987) Specificity problems and essential controls, in *An Introduction to Immunocytochemistry: Current Techniques and Problems* (Hammond, C., ed.), Oxford University Press, Microscopical Society, Oxford, UK, pp. 33—36.

[26] Mazzini, G. and Danova, M. (1994) Citometria a flusso. Applicazioni cliniche dell'analisi del DNA in oncologia. Ed. SSOSB-Scuola Internazionale di Oncologia e Medicina sperimentale, Genova, I.

第 26 章　多参数流式细胞术分析正常及过度增生性皮肤的增殖、分化和炎症

Piet E. J. van Erp

摘　要：我们对以异常生长为特征的皮肤疾病的病因学、发病机制知之不多，甚至对正常表皮中如何控制表皮生成也所知甚少。现今仍无法治愈因皮肤生长调控异常所致的很多皮肤疾病，如银屑病。由于其发病机制复杂，所以有必要制作更多的表皮生长分化模型，并用特殊的技术去分析这些病理过程。我们应用流式细胞计量技术研究表皮生长已有 20 年历史。准确可靠的流式细胞技术分析的先决条件是有高质量的表皮单个细胞悬液。本章叙述了制备单个细胞悬液的实验方案，以及用多参数流式细胞术分析正常及过度增生性表皮生长行为的实验方案。

关键词：表皮；皮肤疾病；过度增生；多参数流式细胞术

1　导言

皮肤是一个器官，“它具有独特的外形，各式各样的附件，它包裹或者说支撑着身体所有的其他器官，但它仍然是一个单独的、整合的器官”[1]，它的主要功能是作为身体内、外环境之间的屏障。然而，皮肤还通过产生含蛋白质和脂质的死细胞层，部分地发挥物理和静电屏障的功能；皮肤也是具有调控和通讯功能的高度组织化结构。

皮肤外侧部分是表皮，它主要由角质形成细胞构成（占 90%～95%），其所产生的交联蛋白和中性脂质形成了最外侧的保护性屏障。此外，皮肤还含有具特殊功能的特种细胞，例如，具有抗原提呈功能起免疫保护作用的郎格汉斯细胞和能产生黑色素对紫外线照射起保护作用的黑色素细胞。表皮是不断更新的上皮组织，较下层的细胞分裂替代已分化的死亡角化细胞，并使之由皮肤表面呈鳞屑状脱落，留下具有组织结构的物理屏障起保护作用，这种受控制的细胞产生过程被称为表皮生成[2]。

我们对以异常生长为特征的皮肤疾病的病因学和发病机制的了解相对有限，对正常表皮中如何调控表皮生成知之更少，目前仍无法治愈生长调控异常所致的皮肤疾病，如银屑病。由于其发病机制复杂，所以有必要制作更多的表皮生长分化模型，并用特殊的技术去分析这些病理过程。因此，在过去的 20 年里我们发展了新颖的免疫组织化学和流式细胞计量技术来研究表皮的生长[3～10]。高质量的表皮单细胞悬液是进行准确和可靠的流式细胞检测分析的一个必要条件。在这一章里描述了制备单细胞悬液的实验方案，以及用多参数流式细胞术分析正常及过度增生性表皮生长行为的实验方案。

2 材料

2.1 临床材料

皮肤样本来源于无皮肤疾病体征的健康志愿受试者和患过度增生性皮肤病寻常型银屑病患者的病损皮肤。在活组织检查前必须征得所有受试者的同意。

用带金属防护的保险刀片切取微量活检标本（直径 3 mm、厚度约 2 mm）。当需要的面积更大时，可用取皮机从正常皮肤或病损银屑病皮肤切取活检组织。在氯乙烷喷雾剂（Maxxim Medical Europe BV，Oss，The Netherlands；cat. no. PD2175/1）局部麻醉诱导后，使用带金属防护的小取皮机（Coriotome，Aesculap，Tuttlingen，Germany；cat. no. 6B333）获得面积 1 cm^2 的皮肤样本，厚度可为 0.2 mm（正常皮肤）或者 0.4 mm（银屑病皮肤）。用打孔器（3 mm 或者 4 mm）做活组织检查获取正常皮肤和银屑病皮肤时，可使用含肾上腺素（1∶100 000）的利多卡因进行局部麻醉诱导。

2.2 免疫细胞化学检测所用的抗体

（1）小鼠抗角蛋白 10 单克隆抗体（克隆号 RKSE60），同种型 IgG1（Monosan，Uden，Netherlands；cat. no. MON3010）。在最终孵育体积中的稀释度为 1∶20。这一单克隆抗体在免疫印迹中能与 56.6 kDa 角蛋白[属于 Moll（1982）角蛋白目录的编号 10]发生反应。它与角质化的鳞状上皮发生特异性反应，可用于识别鳞状上皮细胞癌（来源于表皮、肺、膀胱、宫颈和食道）中的角质化细胞。此外，由于该抗体只与表皮的角质化（基底层上）细胞而不与基底细胞反应，因而也应用于皮肤疾病的研究。它可与来自大鼠、小鼠和牛组织的角蛋白发生交叉反应。

（2）小鼠抗角蛋白 16 单克隆抗体（克隆号 K8.12），同种型 IgG1（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO；cat. no. C7034）。在最终孵育体积中的稀释度为 1∶20。这一单克隆抗体与角蛋白 13、15、16 起反应，它标记非角化的鳞状上皮、假复层上皮的基底层及移行上皮。K8.12 不与正常表皮或大多数的单层上皮细胞反应，它与所有接受检验的鳞状上皮细胞癌反应，但不与腺癌反应。此外，过度增生性皮肤的基底层上表皮也呈阳性染色。

（3）小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体（克隆号 VIM 3B4），同种型 IgG2a（Novocastra Laboratories Ltd，Newcastle Upon Tyne，United Kingdom；cat. no. NCL-VIM）。在最终孵育体积中的稀释度为 1∶50。该单克隆抗体直接针对人的中间丝波形蛋白亚基，识别人表皮中的所有非角质形成细胞，包括病态皮肤中的炎性浸润细胞。

（4）小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体（克隆号 V9），同种型 IgG1（Monosan，Uden，Netherlands；cat. no. MON3005）。在最终孵育体积中的稀释度为 1∶20。波形蛋白是间充质细胞中间丝的主要亚单位蛋白，分子质量为 57 kDa。与通常为阴性的癌比较，它来源于神经、肌肉和成纤维细胞的肉瘤的特征是波形蛋白的免疫组织化学染色阳性。黑色素瘤、淋巴瘤和血管肿瘤都可以呈现波形蛋白染色。因此，V9 可识别人表皮中的所有非角质形成细胞，包括病态皮肤中的炎性浸润细胞。此抗体可在正常人淋巴细胞溶

解物的免疫印迹中将 57 kDa 的波形蛋白带染色。它不与小鼠或大鼠的波形蛋白反应，对角蛋白、神经胶质酸性蛋白（GFAP）、神经丝蛋白和结蛋白也没有可检测到的交叉反应。

（5）小鼠抗角蛋白 16 单克隆抗体（克隆号 LHK6B），同种型 IgG2a（Novocastra Laboratories Ltd.，Newcastle Upon Tyne，United Kingdom；cat. no. NCL-CK6）。在最终孵育体积中稀释到 1∶20。该抗体与分子质量为 56 kDa 的人角蛋白中间丝蛋白（已鉴定为细胞角蛋白 6）反应，与平滑肌有一定程度的交叉反应。在正常表皮中不能检测到该蛋白质，然而在异常增生性皮肤情况下，其可显著表达于基底层上。

2.3 试剂

2.3.1 微活检法的细胞悬液制备

（1）磷酸盐缓冲盐溶液（PBS；1 L）：8.2 g NaCl（Merck，Darmstadt，Germany；cat. no. 106404）；1.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$（Merck；cat. no. 106580）；0.3 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$（Merck；cat. no. 106345）；pH 7.2～7.4。

（2）1%胰蛋白酶-0.3% DTE 溶液（10 ml）：新鲜配制，100 mg 胰蛋白酶 250（Difco，Detroit，MI；cat. no. 0152-15）和 30 mg 二硫赤藓醇（DTE）（Sigma-Aldrich；cat. no. D-8255）溶解于 10 ml PBS。

2.3.2 取皮机法的细胞悬液制备

（1）PBS（见 2.3.1）。

（2）胰蛋白酶-DTE 溶液（10 ml）：新鲜配制，2.5 mg 胰蛋白酶（Sigma-Aldrich；cat. no. T-4665）和 30 mg 二硫赤藓醇（Sigma-Aldrich；cat. no. D-8255）溶解于10 ml PBS。

（3）含有 20%小牛血清的 PBS。

（4）RNA 酶溶液（A）：25 mg RNA 酶 A（Sigma-Aldrich；cat. no. R-4875）溶解于 10 ml PBS，分装为 1 ml，保存于−20℃。

2.3.3 采用优化的嗜热菌蛋白酶——胰蛋白酶实验方案制备表皮细胞悬液

（1）含 Ca 和 Mg 的达尔伯克氏 PBS（Seromed，Berlin，Germany；cat. no. L-1815）。

（2）嗜热菌蛋白酶溶液（10 ml）：新鲜配制，5 mg 嗜热菌蛋白酶（Protease type X，Sigma-Aldrich；cat. no. P-1512）溶解于 10 ml 达尔伯克氏 PBS。

（3）不含 Ca 和 Mg 的 PBS（NPBI，Amsterdam，Netherlands；cat. no. D 1011，pH 7.4）。

（4）胰蛋白酶-DTE 溶液（10 ml）：新鲜配制，2.5 mg 胰蛋白酶（Sigma-Aldrich；cat. no. T-8253）和 30 mg 二硫赤藓醇（Sigma-Aldrich；cat. no. D-8161）溶解于10 ml PBS。

（5）热灭活的新生小牛血清（NHCS）（Life Technologies，Paisley，United Kingdom；cat. no. 26010-033）。

2.3.4 染色步骤

(1) PBS(见 2.3.1)。

(2) 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗小鼠抗体(RAM-FITC):配制 5 ml FITC 结合的二抗,取 200 μl FITC 结合的抗小鼠免疫球蛋白的兔 F $(ab')_2$(Dako, Copenhagen, Denmark; cat. no. F0313)、200 μl 正常兔血清和 4.6 ml PBS 混合。

(3) 碘化丙啶(PI)染色液(500 ml):20 mg PI(Calbiochem, San Diego, CA; cat. no. 537059),溶解于 500 ml PBS,避光保存于 4℃。

(4) RNA 酶溶液(B)(10 ml):100 mg RNA 酶 A(Sigma-Aldrich; cat. no. R-4875),溶解于 10 ml PBS,分装为 1 ml,保存于−20℃。

(5) 含 1% NHCS 的 PBS。

(6) 二抗混合物:配制 3450 μl(10 只试管),21 μl 藻红蛋白(PE)结合的山羊抗小鼠 IgG1 的 F $(ab')_2$(Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL; cat. no. 1072-09);106 μl FITC 结合的山羊抗小鼠 IgG2a 的 F $(ab')_2$(Southern Biotechnology Associates Inc.; cat. no. 1082-02);106 μl 正常山羊血清;3217 μl PBS。

(7) 碘化 TO-PRO-3(TP3 iodide)染色剂(50 ml):100 μl 1 mmol/L 碘化 TO-PRO-3(Molecular Probes, Eugene, OR; cat. no. T-3605)的 DMSO 溶液和 50 ml PBS,避光保存于 4℃。

(8) DAPI/Triton X-100 染色剂(10 ml):新鲜配制,10 μl 1 mg/ml DAPI 水溶液储备液(4′, 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Molecular Probes; cat. no. D-1306;避光或用锡箔包裹瓶子,置于−20℃能储存数月),10 ml 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液。

2.4 仪器、设置和软件

按 3.1 中的方法制备细胞悬液,使用标准的超声破碎器(Sonifier 250, Branson Sonic Power Company)。在 Coulter 流式细胞仪(Beckman-Coulter, Luton, United Kingdom; model Epics Elite)上分析样本。流式细胞仪配备了三种激发的激光:一个是空气冷却的 488 nm 氩激光器,设置在 15 mW(用于 FITC、PE 和 PI 染色,前向散射和直角散射信号);一个是 10 mW 的 633 nm 氦氖激光,用于 TP3 染色法;还有一个可调的水冷式氩激光器,设置在 80 mW、356 nm 的激发光用于 DAPI 染色。当同时使用 356 nm 和 488 nm 的激发光时,两条激光束在空间上分离,所产生的荧光信号相距 40 μs。以这种方式可以避免 DAPI 和 FITC 荧光光谱的相互干扰。

使用 Coulter Elite 的标准滤光器进行免疫表型分析,525 nm 带通滤光器(Beckman-Coulter; cat. no. 3814134)检测 FITC 的发射光,575 nm 带通滤光器(Beckman-Coulter; cat. no. 3814135)检测 PE 的发射光。对 PI、TP3 和 DAPI 的发射光来说,分别使用 630 nm 长道滤光器(Ortho; cat. no. 4800A-354)、675 nm 带通滤光器(Beckman-Coulter; cat. no. 3814139)和 450 nm 带通滤光器(Zeiss; cat. no. 467984)。为了测量细胞的相对大小,可用 488 nm 的带通(窄带)滤光器(Beckmann-Coulter; cat. no. 3814137)收集蓝光的侧向散射(直角散射),光电二极管可用于收集前向

散射。

为了脱氧核糖核酸（DNA）的直方图标准化，我们同时使用流式检验用荧光小球（Flow-Check fluorespheres，Beckmann-Coulter；cat. no. 6605359）和乙醇固定的人淋巴细胞。以如下方式调节仪器，采用流式检验用荧光小球，变异系数（CV）峰值的一半应低于1.5；使用人淋巴细胞，CV峰值的一半应低于3。此外，在评估所有的已染色细胞悬液前，先评估正常人角质形成细胞的样本来调整信号增幅。

使用WinList流式细胞计量术软件5.0版本（Verity Software House，Inc.，Topsham，ME)，可设定窗口（或门）来计算表达一种特异中间丝蛋白或多个蛋白质的细胞比例。一般而言，一次计数完成设定为20 000个角质形成细胞，若可能则设定为10 000个基底角质形成细胞（如用适当的单克隆抗体标记）。使用ModFit DNA分析软件3.0版本（Verity SoftwareHouse，Inc.，Topsham，ME）可以从DNA直方图计算出细胞动力学的特性。

3 方法［见注意事项（1)］

3.1 从保险刀片微量活检的样本制备表皮细胞悬液

（1）通常用配有15cm × 2 cm金属防护装置的保险刀片削取背部或上臂的皮肤作为活检样本。金属防护装置上的一个直径5 mm孔可用于重复制作大小一致的活检组织（约0.2 mm厚，直径3 mm)。

（2）将组织真皮面向下放置于盛有数滴胰蛋白酶/DTE溶液的有盖培养皿中，37℃孵育20 min。

（3）孵育后，把皮片移入装有500 μl PI溶液的小试管中，超声处理2 s以分离表皮。

（4）加入100 μl胎牛血清以抑制残留的胰蛋白酶。

（5）用PBS洗涤细胞悬液一次，网布过滤（滤网孔径约120 μm)。这一过程中角质层和真皮层应保持完整，制备出的单细胞悬液几乎不混有真皮细胞。

（6）500 *g* 离心沉降细胞，重新悬浮，在连续涡旋混匀下同时固定于1 ml冰冷的70%乙醇中。固定后的细胞悬液储存于−20℃直到下一步使用。

3.2 从取皮机获得的活检样本制备表皮细胞悬液

（1）用氯乙烷喷雾剂冷却皮肤后，用小型取皮机切取皮肤样本，它所配备的钢制防护装置可使活检组织限制在约1 cm^2。设置取皮机切取的平均厚度为正常皮肤0.2 mm，银屑病皮肤0.4 mm。

（2）在盛有胰蛋白酶/DTE溶液（见2.3.2）的塑料有盖培养皿（直径60 mm）中漂浮皮肤组织，真皮面向下，37℃孵育30 min。

（3）把完整的样本转入盛有2 ml 20%小牛血清PBS溶液（PBS/血清）的第二个有盖培养皿中。从表皮上剥下真皮并弃掉。将培养皿中的剩余物（PBS/血清中的表皮和少许已分离的细胞）转入一支试管，放在涡旋混合器上并轻轻地振荡1 min。

(4) 清除透明的角质层，加入 50 μl RNA 酶 A 溶液，37℃孵育试管 30 min。

(5) 用网布（滤网孔径大约 120 μm）过滤试管内容物，用 2 ml PBS/血清清洗残渣。

(6) 100 *g* 离心 10 min 沉降细胞，再悬浮后，采用适当体积的冰冷 70%乙醇（通常 1～2 ml）固定。固定后的细胞悬液可在－20℃一直保存至使用前。

3.3 用优化的嗜热菌蛋白酶-胰蛋白酶实验规程制备表皮细胞悬液［见注意事项（2）］

(1) 在利多卡因和 1%肾上腺素局部麻醉下，获取 3 mm 或 4 mm 的临床常规打孔活组织检查样本。

(2) 用不含 Ca 和 Mg 的 PBS 冲洗。必要时用手术刀将样本切短（活检组织的长度大约 2 mm）。把活检组织移入盛有 1 ml 嗜热菌蛋白酶溶液的小试管中，4℃孵育过夜（16～20 h）。

(3) 嗜热菌蛋白酶溶液孵育后，使用眼科镊分离表皮和真皮。将表皮放入一个含有 2～3 ml 胰蛋白酶/DTE 溶液的新试管中，37℃孵育 30 min，弃去剩余的真皮。

(4) 把试管置于冰水中，每毫升溶液加入 100 μl NHCS 以终止胰蛋白酶/DTE 溶液的作用，然后在涡旋振荡器上振荡含有表皮的试管 1 min。去除透明的角质层后100 *g* 离心 10 min，并沉淀细胞，再用适当体积的冰冷 70%乙醇（通常 1～2 ml）重悬和固定细胞。固定后的细胞悬液可在－20℃一直保存至下一步使用前。

3.4 抗皮肤特异中间丝蛋白单克隆抗体联合 DNA 特异染料 PI 的双参数流式细胞术分析

(1) 使用分装的乙醇固定细胞（100 000～200 000 个细胞）悬液。室温下 1500 *g* 离心 5 min，去除上清液。

(2) 将细胞沉淀再悬浮于 2 ml PBS 溶液中，按以前的方法离心。

(3) 在剩余的体积（大约 175 μl）内重悬细胞沉淀物，加入 325 μl 适当稀释的第一单克隆抗体（见 2.2），冲洗混匀，室温避光孵育 30 min。对照细胞做同样处理但只与相同稀释度的同型抗体或与 325 μl PBS 孵育。

(4) 30 min 后，用 2.5 ml PBS 洗涤孵育混合物，如前法离心后弃去上清液。

(5) 加入 325 μl RAM-FITC 溶液再悬浮细胞沉淀，混匀悬液，避光冰上孵育 15 min。

(6) 15 min 后，用 2.5 ml PBS 洗涤细胞悬液，如前法离心后弃去上清液。

(7) 在 400 μl PI 染色缓冲液中悬浮细胞沉淀，再加入 50 μl RNA 酶溶液。在流式细胞仪检测前，室温避光孵育 10 min。

(8) 设置流式细胞仪，调节 15 mW 气冷氩激光器发出蓝色（488 nm）的激发光。使用 525 nm 带通滤光片检测 FITC 发射光，用 630 nm 长通滤光片检测 PI 散射光。

(9) 测量中间丝蛋白质相关的 FITC 绿荧光（对数标尺）和 DNA 相关的 PI 红荧光，收集红荧光信号的面积和峰值。面积/峰值的比率是一个很好的鉴别参数，可以区

分二倍体细胞的双联体假象和真正的四倍体细胞［见注意事项（3）］。以表格模式保存数据，并用 Verity 软件进行分析（见 2.4）。图 26.1 是一个染色的实例。

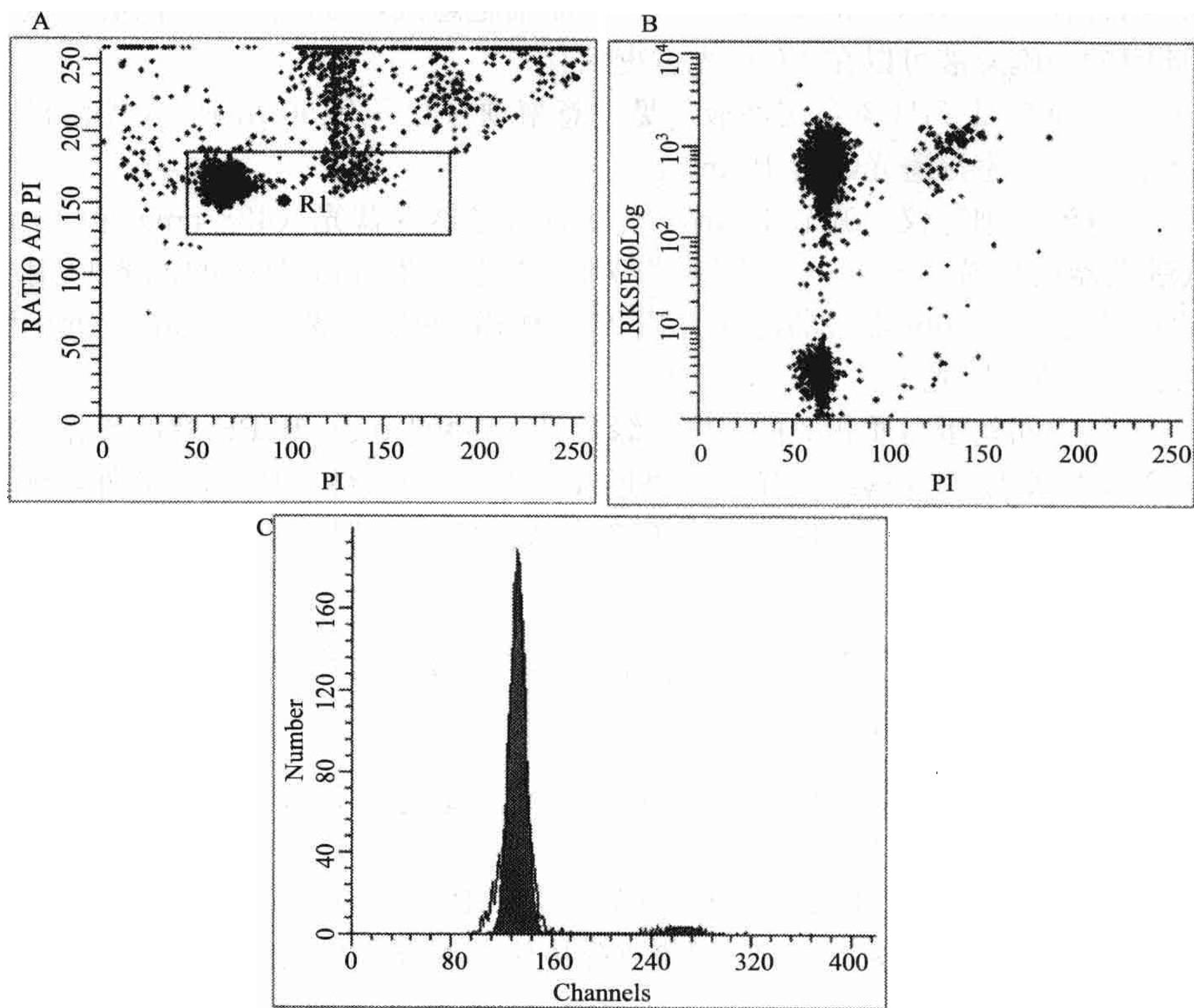


图 26.1　在 3.4 中所述方法的实例：用抗角蛋白 10 的单克隆抗体（RKSE60）标记来源于正常皮肤的表皮细胞

A. 显示 PI 荧光信号的面积/峰值比值（y 轴）是鉴别二倍体细胞双联体所产生的假象和真正的单个四倍体细胞之间一个极好的指标。x 轴绘制了 PI 荧光信号的积分面积，代表每一个细胞的相对 DNA 含量。B. 表明能清晰地辨别出 RKSE60 阳性和 RKSE60 阴性细胞（y 轴）。x 轴也绘制了 PI 荧光信号的积分面积。C. 显示 DNA 的直方图，G_0-G_1、S、G_2-M 期细胞的百分比即由该图计算而来。

3.5　用优化嗜热菌蛋白酶-胰蛋白酶实验方案所获样本的三参数流式细胞术特征

（1）在小于 500 μl 的 70%乙醇中准备约 200 000 个已固定细胞为待检样本。

（2）染色前，用 2.5 ml PBS 洗涤细胞悬液，1500 *g* 离心 5 min。移除上清液，在残留的体积（约 175 μl）内悬浮细胞，涡旋振荡混匀。

（3）每一个样本加入 150 μl RKSE60（抗角蛋白 10 的 IgG1 同种型单克隆抗体）。再加入 150 μl 的 VIM 3B4（抗波形蛋白的 IgG2a 同种型单克隆抗体）。

（4）室温避光孵育 30 min。然后加入 2.5 ml 含 1% HNCS 的 PBS，再次洗涤细胞。

（5）随后，加入 325 μl 的第二抗体混合物，即含有同种型特异性的 FITC 和 PE 结

合的第二抗体，冰上避光孵育此悬液 15 min。抗体的最终稀释度分别为 1∶50 和 1∶250。

(6) 用含有 1% NHCS 的 PBS 2.5 ml 洗涤细胞悬液，按前述方法离心，重悬细胞沉淀。此时的细胞悬液可以在 4℃避光过夜保存。

(7) 加入 300 μl TP3 染色缓冲液［见注意事项 (4)］和 50 μl RNA 酶溶液。在流式细胞术检测前，室温避光孵育 10 min。

(8) 设置流式细胞仪，调节 15 mW 气冷氩激光器的蓝光 (488 nm) 和 10 mW 气冷氦-氖激光器的红光 (633 nm) 同时作为激发光。525 nm 带通的滤光片用于检测 FITC 的发射光，575 nm 带通的滤光片用于检测 PE 的发射光，675 nm 带通的滤光片用于检测 TP3 的发射光。

(9) 测量中间丝蛋白质相关的 FITC 绿荧光 (对数标尺) 和 PE 橙色荧光 (对数标尺) 及 DNA 相关的 TP3 远红荧光。收集远红荧光信号的面积和峰值。此外，测量前向和侧向散射信号，用表格模式保存来自 6 个参数测定的数据，使用 Verity 软件进行数据分析 (见 2.4)。

3.6 反映皮肤增殖特征的功能性多参数流式细胞术分析［见注意事项 (5) 和 (8)］

(1) 所用的每个细胞悬液样本含有约 200 000 个细胞 (见 3.5)；洗涤、离心、再重新悬浮细胞沉淀。

(2) 用含有 RKSE60、LHK6B 和 V9 的 100 μl PBS 孵育［见注意事项 (6)］。这些单克隆抗体的最终稀释度为 1∶20。用单克隆抗体的混合物与细胞悬液在室温避光孵育 30 min。

(3) 用含有 1% NHCS 的 PBS 洗涤，然后用含有同种型特异性的 FITC 和 PE 结合的二抗混合物在冰上避光标记 15 min，抗体的最终稀释度分别为 1∶50 和 1∶250。

(4) 按前法洗涤细胞悬液，重悬。此时，细胞悬液可以 4℃避光保存过夜。

(5) 每一个样本可加入 400 μl DAPI/Triton X-100 染色液［见注意事项 (7)］进行 DNA 染色，10 min 后进行流式细胞术检测。

(6) 设置流式细胞仪，调节两种同时起作用的激发光，一种是来自于 80 mW 水冷氩激光器 (Spectra Physics) 的紫外光 (356 nm)，另一种是来自 15 mW 气冷氩激光器的蓝光 (488 nm)。这两个在空间上分离的激光束所产生的荧光信号相距 40 μs。525 nm带通的滤光片用于检测 FITC 的发射光，575 nm 带通的滤光片用于检测 PE 的发射光，450 nm 带通的滤光片用于检测 DAPI 的发射光。

(7) 测量中间丝蛋白质相关的 FITC 绿荧光 (对数标尺) 和 PE 橙色荧光 (对数标尺) 及 DNA 相关的 DAPI 蓝色荧光。收集蓝荧光信号的面积和峰值，并测量前向和侧向的散射信号。前向散射或侧向散射信号为分离角蛋白 10 和波形蛋白染色所必需。用表格模式保存来自 7 个参数测定的数据，使用 Verity 软件进行数据分析 (见 2.4)。图 26.2显示一个染色的实例。

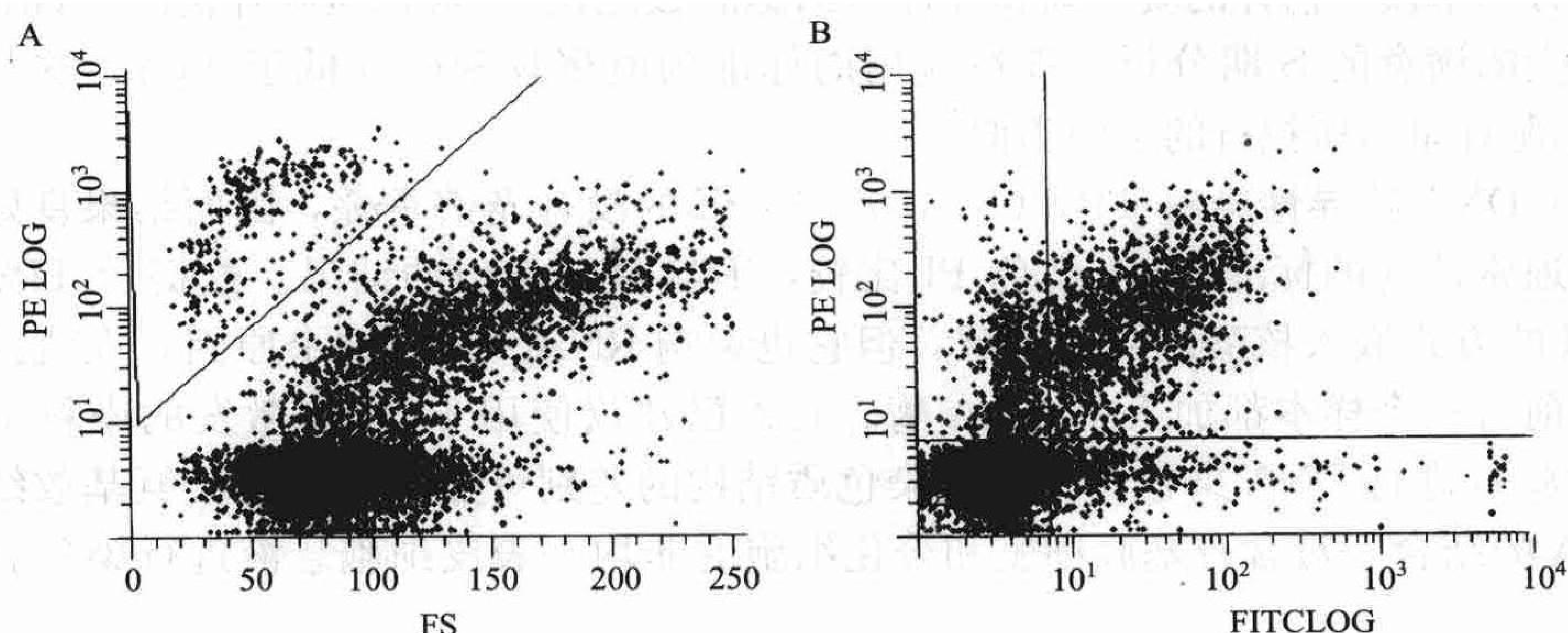


图 26.2 在 3.6 中所述方法的实例：来源于银屑病病损皮肤的表皮细胞同时用单克隆抗体 RKSE60（角蛋白 10）、LHK6B（角蛋白 6）和 V9（波形蛋白）标记

A 图左上部分三角形范围（门）内的细胞小（弱前向散射，x 轴）而 PE 荧光很强，代表波形蛋白阳性的非角质形成细胞（主要为浸润的粒细胞）。最大的细胞（强前向散射）也呈 PE 荧光阳性，属于已分化的角蛋白 10 阳性的角质形成细胞。B 图中不包括设置于门外的非角质形成细胞，留下了 LHK6B（角蛋白 6，FITC-LOG，x 轴）对 RKSE60（角蛋白 10，PE-LOG，y 轴）的双变量直方图。未标记的角质形成细胞位于左下象限，RKSE60 单标记的细胞在左上象限，LHK6B 单标记的细胞在右下象限，双标记的细胞在右上象限。

4 注意事项

（1）在 3.1 中所介绍的方法简单而快速。然而，在 3.2 和 3.3 中的方法更具可重复性。在 3.3 中的嗜热菌蛋白酶-胰蛋白酶实验操作规程因其使用临床常规的打孔器活检组织检查来获得 3～4 mm 直径的样本而更为可取。此外，它有选择地获得整个表皮，不仅可自正常皮肤获取，也可自患有异常增生性皮肤疾病者中获取。因为只需要表皮，所以包含表皮和极少量真皮的相对表浅的活组织检查即可满足需要。从每块活检组织可获得的细胞数范围为：正常皮肤为 150 000～300 000 个；过度增生性皮肤疾病皮肤为600 000～1 000 000 个。当需要更多的细胞时，可使用取皮机活检 1 cm^2的皮片。

（2）在使用嗜热菌蛋白酶-胰蛋白酶的实验操作规程中，波形蛋白阳性细胞来自样本的表皮。在过度增生性皮肤疾病的情况下，这意味着波形蛋白阳性细胞将主要由表皮的浸润细胞组成。

（3）流式细胞术使用碎片消除的设门技术，并以表格模式收集相关数据：使用 DNA 信号（PI、TP3 和 DAPI）的面积/峰值比率结合散射参数来鉴别细胞周期 G_1 期中的双联体细胞和细胞周期 G_2-M 期的细胞。虽然用适当硬件设门与软件补偿进行凝聚物校正的问题仍然存在争论[11]，但是我们皮肤疾病教研室已多年使用硬件设门的技术，且与以前介绍过的一种方法相一致[12]。因此，碎片不能通过数学的方法从 DNA 直方图计算出来，而是从表格模式文件中测定凝聚物和碎片来完全排除碎片。由于已经排除了凝聚物和碎片，因此，不能计算出直方图中的背景凝聚物和碎片百分率（%BAD，定

义为直方图中模型估计的凝聚物和碎片与细胞总数之比）。就物质碎片消除来说，为获得可接受的满意的 S 期分析，现在应用的标准为凝聚物和碎片低于 20%，这与临床 DNA 细胞计量术所执行的指南类似[11]。

（4）DNA 特异性染料 TP3（见 3.5）与 PE 的没有光谱重叠，因而结果良好，尤其是与通常认为的标准 DNA 染色 PI 比较，TP3 显示类似的结果。这提示 TP3 以类似于 PI 的方式嵌入核酸的双链区域，但它也影响 RNA。基于这个原因，在流式细胞术测定前每一个样本都加入了 RNA 酶。有人已建议使用 488 nm 激发的染料 7-氨基放线菌素 D 进行 DNA 染色。但是，染色质结构的差别可显著地影响 7-氨基放线菌素与 DNA 的结合。对含有基底细胞和分化细胞的非均一表皮细胞悬液进行染色就是典型的例子。

（5）为建立一个简单的染色步骤和一个临床相关的流式细胞术检测法（见 3.6），我们试验了抗角蛋白 10、抗角蛋白 6 和抗波形蛋白的几种同种型特异性单克隆抗体的各种组合。由于我们的兴趣在于通过增加更多的参数来扩大实验操作方案，因此，我们探索了多种抗体的组合，可以在只用两种荧光标记的同时来评估所有的三个标记。我们发现，抗角蛋白 10（RKSE60）和抗波形蛋白单克隆抗体同种型的特定选择可对这两种都用 PE 标记的细胞群体进行定量。

（6）为了同时测量 IgG1 特异性抗角蛋白 10 标记 RKSE60 和除了波形蛋白以外的过度增生性标记（见 3.5），我们注意到一个非 IgG1 特异性的过度增生性标记。虽然抗角蛋白 16 标记 LL025 是一个已充分证明的过度增生性标记，但因它是 IgG1 特异性的，我们不能使用。LHK6B（NCL-CK6，Novocastra Laboratories）是一个 IgG2a 特异性的单克隆抗体，它直接针对过度增生性相关的角蛋白 6。因为 LHK6B 属于 IgG2a 同种型，且被描述为良好的过度增生性标记，我们已关注这一标记物。

（7）在各种 DNA 特异性染料中，DAPI 与 DNA 的原位结合所受细胞核蛋白的影响最小。因此，DAPI 似乎是最适合于化学计量染色法的荧光染料。然而，其缺点是需要额外的紫外激光。把 TP3 换为 DAPI（见 3.5）可为与抗体偶联的第三种荧光染料留下发射光谱的红光端，如共振能量传递染料 Cy5-藻红蛋白。DAPI 是一个非常明亮的染料，在其发射荧光的区域内自发荧光很弱。DAPI 很容易在 488 nm 被激发，并在 680 nm发射荧光，因此它能与 FITC 和 PE 联合应用。

（8）临床评估银屑病疾病严重程度的一个常用方法是银屑病面积和严重程度指数。在这个评分系统中，对患病面积百分数及红斑（炎症）、硬结（增殖）和脱屑（分化）程度进行了评价。这些都是这一过度增生性皮肤病的标志。利用公式可计算出的序数值在 0～72 之间，然而，这一指数不能被视为精确的数值，因为严重程度的等级是主观性的，所以必须有银屑病严重程度的客观测量方法。本章尤其是在 3.5 中所介绍的实验方案就是建立表皮增殖（DNA 含量）、分化（抗角蛋白 6、10）和炎症（抗波形蛋白）标记物同步染色，并进行多参数流式细胞计数测定的结果。与临床评分相比，流式细胞术可以对不同参数进行定量分析（表 26.1）。我们已经用 3.5 中的方法完成了 83 例患者 166 个成对数值的相关分析[8]。在红斑和波形蛋白阳性细胞百分率之间，脱屑和角蛋白 10 阳性细胞百分率之间，以及硬结和细胞周期 S 和 G_2-M 期的基底角质形成细胞数目之间均存在非常显著的相关。总之，结果显示多参

数流式细胞术是评价抗银屑病治疗的抑制生长、抗炎和增强角质化效应的一个敏感工具。

表 26.1　不同单克隆抗体测定正常和银屑病患者表皮细胞的阳性细胞百分率

克隆	特异性	同种型	阳性细胞百分率					
			副标题 3.4[5]		副标题 3.5[7,13]		副标题 3.6[a]	
			N	PL	N	PL	N	PL
RKSE60	Keratin 10	IgG1	57.2±3.5	46.6±8.3	70.0±3.6	27.4±3.2	70.7±2.1	42.5±3.7
K8.12	Keratin 16[13,15]	IgG1	1.8±1.0	40.4±19.5	N.D	N.D.	N.D.	N.D.
LHK6B	Keratin 6	IgG2a	N.D.	N.D.	0.6±0.1	18.0±3.9	6.9±0.9	29.0±4.0
Vim3B4	Vimentin	IgG2a	N.D.	N.D.	7.2±0.6	15.1±2.4	N.D.	N.D.
V9	Vimentin	IgG1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.1±0.6	3.4±0.4

a. 未发表的数据。
N.D. 未检测。

致　谢：作者感谢 UMCN 皮肤病学研究实验室的现在和过去的其他成员，他们对建立上述实验方案作出了贡献。

（严　泉　郑必祥 译　彭代智 校）

参 考 文 献

[1] Mier, P.D. and Cotton, D.W.K. *The Molecular Biology of Skin*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1976.

[2] Bauer, F.W. (1986) Cell kinetics, in *Textbook of Psoriasis* (van de Kerkhof PCM, ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 100—112.

[3] Bauer, F.W., Crombag, N.H., de Grood, R.M., and de Jongh, G.J. (1980) Flow cytometry as a tool for the study of cell kinetics in epidermis. *Br. J. Dermatol.* **102**, 629—639.

[4] van Erp, P.E., Brons, P.P., Boezeman, J.B., de Jongh, G.J., and Bauer, F.W. (1988) A rapid flow cytometric method for bivariate bromodeoxyuridine/DNA analysis using simultaneous proteolytic enzyme digestion and acid denaturation. *Cytometry* **9**, 627—630.

[5] van Erp, P.E., Rijzewijk, J.J., Boezeman, J.B., Leenders, J., de Mare, S., Schalkwijk, J., et al. (1989) Flow cytometric analysis of epidermal subpopulations from normal and psoriatic skin using monoclonal antibodies against intermediate filaments. *Am. J. Pathol.* **135**, 865—870.

[6] de Mare, S., van Erp, P.E., Ramaekers, F.C., and van de Kerkof, P.C. (1990) Flow cytometric quantification of human epidermal cells expressing keratin 16 in vivo after standardized trauma. *Arch. Dermatol. Res.* **282**, 126—130.

[7] Glade, C.P., Seegers, B.A., Meulen, E.F., van Hooijdonk, C.A., van Erp, P.E., and van de Kerkof, P.C. (1996) Multiparameter flow cytometric characterization of epidermal cell suspensions prepared from normal and hyperproliferative human skin using an optimized thermolysin-trypsin protocol. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 203—210.

[8] Glade, C.P., van Erp, P.E., Boezeman, J.B., and van de Kerkof, P.C. (1997) Multiparameter flow cytometry as a tool to evaluate antipsoriatic therapy. *Br. J. Dermatol.* **137**, 367—375.

[9] Mommers, J.M., Goossen, J.W., van De Kerkhof, P.C., and van Erp, P.E. (2000) Novel functional

multiparameter flow cytometric assay to characterize proliferation in skin. *Cytometry* **42**, 43—49.

[10] Seegers, B. A., Glade, C. P., van Hooijdonk, C. A., van Erp, P. E., de Jongh, G. J., and van de Kerkof, P. C. (2000) Flow-cytometric characterization of normal versus psoriatic epidermis using improved cell separation methodology. *Exp. Dermatol.* **9**, 266—270.

[11] Shankey, T. V., Rabinovitch, P. S., Bagwell, B., Bauer, K. D., Duque, R. E., Hedley, D. W., Mayall, B. H., Wheeless, L., et al. (1993) Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. International Society for Analytical Cytology. *Cytometry* **14**, 472—477.

[12] Bauer, F. W. and Boezeman, J. B. (1983) Flow cytometric methods in human skin with respect to cell cycle kinetics, in *Psoriasis: Cell Proliferation* (Camplejohn, R. S., ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 104—116.

第27章 细胞数目的DNA荧光测定法

William R. Otto

摘 要：这种荧光测定法是通过与细胞数量相关最显著的细胞脱氧核糖核酸（DNA）含量这一特性来精确评估培养表皮细胞的数量。由于近来对荧光染料的改进，使PicoGreen成为这种测定法可以选择的染料。与Hoechst和DAPI这两种染料相比，PicoGreen非常显著地增加了灵敏度（±50个细胞），并且单一浓度染料的荧光强度就能与几个数量级的细胞数量保持线性相关。这种方法采用十二烷基硫酸钠的枸橼酸钠盐缓冲液，只需最少的液体量操作就完成了细胞的裂解。多孔板读数荧光测定仪可迅速检测PicoGreen染色，自动化后还可用于自动操纵的高处理量的检测。8 mol/L的尿素可以裂解像表皮角质形成细胞这样的高度多纤维细胞，并且在稀释后就能用于检测。这一测定方法也与氚化胸腺嘧啶核苷掺入法相一致。

关键词：DNA测定；细胞生长；荧光测定法；荧光染料；荧光；PicoGreen；Hoechst 33258；Hoechst 33342；细胞培养；表皮；角质形成细胞；氚化胸腺嘧啶核苷；闪烁谱测量法；高处理量

1 导言

多年来已经开发出许许多多的细胞数测定法，其中最简单的是用血细胞计数器来计数细胞，但是这种方法费时，更因混合不匀而易出现不准确，且不能大批量处理。对可分离成单个细胞的细胞群体来说，可以使用流式细胞仪。当由该仪器的激光所激发的细胞流经光电倍增检测仪时，光电倍增检测仪可记录下与细胞体积大小相关的多种细胞参数（如光散射），而且流式细胞仪还可与荧光染料结合，来检测单细胞内的许多成分，如分子、细胞器或细胞类型特异性成分（即DNA、线粒体、转移泡）等。检测细胞内成分，也提供了分离细胞的方法：给液流中含有待测成分的每个细胞分配电荷，当液流在电极板之间通过时，特定电荷的细胞发生偏移从而进入不同的试管中，这就是荧光激活细胞分选术（FACS）的原理。这些高效的方法既需要专业的实验室来操作样本，也需要大量的预算。也有其他的一些方法运用类似的荧光技术在微量培养板上完成操作，因此有可能以更低的价格完成大批量的测定，并能够获得更有意义的信息。人们通常认为荧光测定方法比分光光度计测定法要敏感许多倍，本章描述了一种以荧光检测DNA的方法。

旨在定量细胞数目的许多方法有赖于对细胞内分子的估算，通常不是总蛋白质含量，就是酶的活性，如脱氢酶或者磷酸酶。如果实验中的任何干扰都不改变这些分子在每个细胞中的含量，那么这类测定方法可以说是既快速又准确。然而也有可能会出现这样的情况，在细胞群体中只有一种亚群保持对外界信号（如生长因子、促凋亡剂）的应

答能力，因而可能导致错误的细胞数量检测结果，这对表皮角质形成细胞来说是一个关键问题，因为随着细胞的分层排列，每个细胞蛋白质含量的增加，会导致出现“细胞生长”的蛋白质含量测定结果，从而过高估计细胞的数量［见注意事项（1）］。另一个难题是角质形成细胞一旦达到或者超过颗粒层就会程序化地发生角质化和死亡，这涉及核酸酶的激活，据此，必将减少角化细胞的核酸含量，从而导致更多的误差，相对于每个细胞的蛋白质含量来说，这还不算是个问题，因为角质化的细胞是可以计数的[1,2]。以前已报道过非 DNA 测定法计数细胞相关问题[3,4]。

最能准确反映细胞数量的细胞成分是 DNA，它通常在一个种属内和在任何一个个体的所有细胞中保持准确，仅有很少一些例外，例如，已到达颗粒层并开始降解其细胞内成分的表皮角质形成细胞、红细胞及其最邻近的前体，以及巨核细胞（多倍体）和它们的产物血小板[5]，还有由巨噬细胞融合成的巨大有核细胞或破骨细胞［见注意事项（2）］。另外一个重要细胞是具有规律性多倍体变异的肝细胞，在小鼠中能达到 128 N[6]，对此仅通过 DNA 测定来检测小鼠肝细胞数量的方法当然不会准确。对于癌症中的多倍体最近已有详尽的综述[7]，就是在肿瘤细胞中尽管异核体可能相当的不稳定和有不同的染色体数，也能保持一种相对稳定的核型和 DNA 含量。研究人员应该知晓这些迷惑的问题，并给它们的测定方法做出合适的决定。

DNA 荧光测定法比分光光度计测量法更灵敏、更特异（表 27.1），可以在多孔板中实现自动化操作。最灵敏的方法是用腺嘌呤-胸腺嘧啶（AT）结合的荧光染料，比如，Hoechst33258［双苯甲酰胺（bisbenzamide）：2-［2-（4-羟苯基）-6-苯丙咪唑基］-6-（1-甲基-4-哌嗪基）苯并咪唑・3HCl］[8~14]或者 Hoechst33342[9,15~17]、DAPI（4′，6 二脒基-2-苯吲哚）[18]及最新的高灵敏度的 PicoGreen[8,10,13,14,16,19,20]。这些染料是 DNA 特异性的，实质上优先结合双链 DNA，不受蛋白质和 RNA 干扰。就此而言，它们远远优于菲啶（phenanthridinium）荧光染料，如溴化乙锭[13,21,22]、碘化丙啶[16]。由于后者既与 RNA 结合又跟 DNA 结合，因此还需要 RNA 酶或 DNA 酶以便恰当地估算所感兴趣的核酸。吖啶橙能与 RNA 和 DNA 结合，但在不同的波长发出荧光，故可以作为两种核酸的双测定试剂，但是其对 DNA 的灵敏度低于 Hoechst 或 Picogreen[23]［见注意事项（3）］。TOTO 二聚物的系列染料及其低灵敏度的 TO-PRO 单体都是青蓝化合物，最近已成为核酸测定试剂库的新成员。TOTO 系列与 DNA 的结合要经过几个小时才能达到平衡，因此可能不如可在 5 min 之内迅速结合 DNA 的 PicoGreen 或 Hoechst染料用起来方便[24]。SYTO 系列的染料可结合 DNA 和 RNA，不是单一一种核酸测定可选择的荧光染料，但是它们具有可通透细胞的优点，可以用于活体成像。就该系列的染料而言，SYTO-16 结合 DNA 的荧光信号比结合 RNA 的荧光信号强两倍左右，SYTO-12 或 14 却正好相反。表 27.2 列出了几种核酸结合染料的主要光谱特征。从表 27.2 里可以很清楚地看出，能用于 DNA 特异性结合实验的主要荧光染料是 Hoechst染料、SYBR-1、PicoGreen。而 DAPI 虽然一直用于 DNA 检测，但富含 AU 碱基的 RNA 对此有一些干扰。在这些染料中最敏感的是 PicoGreen，可高达 Hoechst 衍生物的 400 倍[14]，而 SYBR-1 与 PicoGreen 接近[13]。目前还没有真正 RNA 特异性的染料存在，但是 RiboGreen 对此显示了某些特异性[25,26]。PicoGreen 已经应用于整体细胞计数测定[27]、96 孔板的检测[10,28]或基于聚合酶链反应（PCR）的扩增中[19,29]。

表 27.1 几种 DNA 检测法的检出极限

方法[a]	检出极限[b]	参考文献
二苯胺	10 μg/ml	[47]
二氨基苯甲酸	1 μg/ml	[39]
260 nm 的吸光度	250 ng/ml[c]	[46]
吖啶橙	40 ng/ml	[23]
Hoechst 33258	5 ng/ml	[12]
乙啡啶同型二聚体	1 ng/ml[d]	[21]
PicoGreen	25 pg/ml	[14]

a. 二苯胺法和常规吸光度法是在分光光度计上完成的。其他的方法是用荧光计在一特定的波长处检测的（详情见表 27.2）。

b. 在自由溶液中（in free solution）的双链 DNA（dsDNA）。

c. 高度依赖于 DNA 的纯度，因为有来自 RNA 和蛋白质的显著干扰。纯 DNA 的 260 nm/280 nm 吸光度比值应为 1.8，低于 1.8 表明不纯。

d. 与 RNA 结合的乙啡啶也能发出明显的荧光。

表 27.2 可选择性结合核酸的荧光染料的光谱特性（见参考文献 [24]）

荧光染料	激发/nm	发射/nm	DNA 结合	RNA 结合	细胞可透性
吖啶橙 (DNA)	500	526	是	是	是
吖啶橙 (RNA)	460	650	是	是	
DAPI	358	461	是（AT）	少量（AU）	半通透
溴化乙锭	518	605	是	是	否
Hoechst 33258	352	461	是（AT）	否	是
Hoechst 33342	350	461	是（AT）	否	是
PicoGreen	502（485）[a]	523（530）[a]	是	否	未测定
碘化丙锭	535	617	是	是	否
RiboGreen	500	520	是	是	未测定
SYBR Green I	494	521	是	否	未测定
SYBR Green II	492	513	是（单链）	是	未测定
SYTO-16	488	588	是	是[b]	是
SYTO-12	500	522	是[b]	是	是
TOTO-1	514	513	是（双链/单链）（尤其是 5′CTAG3′位点）	是	否

注意事项：小心大多数 DNA 结合染料是致突变的，应由熟练人员在合适的环境中小心操作。

DNA 的结合不是序列特异性的，除非另行说明；DAPI（4′，6 二脒基-2-苯吲哚）更耐光但不如 Hoechst 明亮。

a. 对于读板荧光计（如 Cytofluor）来说，使用荧光通路的合适波长。

AT，腺嘌呤-胸腺嘧啶选择性插入剂；AU，腺嘌呤-尿嘧啶；NT，未测定；ds，双链；ss，单链；SYTO 染料在活细胞检测中是细胞可通透的，但是背景细胞质的荧光可能很高。

b. 比其他核酸的结合低两倍，TOTO-I 与 DNA 的结合可能需要 2 h 才能达到平衡。对于 TOTO-I 和相关的染料避免使用玻璃管，因为它们很容易吸附这些染料。

除直接细胞计数或者 DNA 估算之外，已经用这些染料建立起来许多其他的检测方法，并且与组织学和显微镜技术有很多重叠。例如，PicoGreen 可用于检测端粒酶活性[30]、DNA 损伤与解链[31]、DNA 酶 I 活性[32]、经流式细胞术测微生物病原体的 DNA

指纹印迹[27]、癌症患者血清 DNA[33]、血浆核小体浓度[34]和壳聚糖纳米颗粒 DNA 转染[35]。这些方法有赖于插入染料在特定波长下以 DNA 浓度依赖性方式激发荧光的能力。使用 PicoGreen 可以很容易达到 25 pg/ml 的 DNA 灵敏度[14]，这比 Hoechst 染料高 400 倍左右 [见注意事项（1） 和（2）]。分光光度计测量法不能与这些检测方法的水平竞争，并且更受阻于由未被选择性去除的 RNA 和蛋白质所带来的竞争信号[4]。有些荧光染料能够同时区分核酸的种类（如吖啶橙）。它们无需分离就能检测两种核酸，但是不如 PicoGreen 灵敏 [见注意事项（3）]。这里所描述的荧光检测法适合于微量分析，不需要对样本进行机械性匀浆，除非使用的是组织碎片，但肯定要依靠清洁剂来裂解细胞。已经报道过的早期的荧光测定法，由于其灵敏度低已经停止应用，如二氨基苯甲酸[4]，有兴趣的读者可以此为参考。尽管现在没有考虑选择哪种方法，但使用氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷（^{3}H-TdR）作为补救措施来检测合成 DNA 的细胞群体还是可以考虑的，它可以用放射自显影法和显微镜下单个细胞核评分来作为实验检测的终点[3] [见注意事项（4）]。显然，这种测定法不能测量整个细胞群体的 DNA 含量，也不能测量非合成期细胞的 DNA（除正在进行 DNA 修复的细胞外），但是它可以显示在细胞群体内是否存在增殖活跃的细胞，并具有保存细胞及其相对位置的优点，而那些采用任何匀浆形式的方法则无此优点。一种类似的测定方法是采用免疫细胞化学技术，通过将细胞暴露给胸腺嘧啶脱氧核苷类似物——溴脱氧尿苷（BrdU）[见注意事项（3）] 并测定其掺入，能够由抗溴脱氧尿苷的抗体通过利用沉淀性显色剂使载玻片（或者组织培养皿）上固定样本的阳性胞核成像来完成。显色剂的选择依赖于最终所用抗体上的结合物，例如，结合物为过氧化物酶则可用二氨基联苯胺（DAB），或者结合物为碱性磷酸酶则可用 4-氮蓝四唑/5-溴基-4-氯-3-吲哚基磷酸盐。另一方法是，获得可溶性的产物可使用合适的化合物。对于过氧化物酶来说，它们包括显色剂，如四甲基联苯胺和 2，2′-连氮基-双-（3-乙基-联苯氨-6-酸性硫酸基酸）；或者荧光发生物，如醋酸荧光素和 9-羟基异吩噻唑；或者经增强化学发光出现光发射[3]的 5-氨基-2，3-二氢-1，4-二氮杂萘 [鲁米诺]，可以 96（或其他）孔板模式并配备适当检测器（分别是分光光度计、荧光测量计或发光测量计）的读板仪进行检测。对碱性磷酸酶结合的抗体来说，可溶性产物的等同染料包括显色剂对硝基酚磷酸盐；荧光发生物二磷酸荧光素，或双氟化甲基伞形酮磷酸盐；或发光底物 1，2-双环氧丙烷 [4-叶绿素] 3-（4-甲氧螺环 {1，2-双环氧丙烷-3，2′-（5′-叶绿素）三环- [3. 3. 1. $1^{3,7}$] 正癸醛} -4-烃基）磷酸苯酯。

一旦准备好用来分析的样本，以 Hoechst、DAPI 或 PicoGreen 为基础的检测基本上有两个操作步骤。对于体外细胞的检测，应洗尽培养基，用十二烷基硫酸钠（SDS）溶解细胞，加入染料并用合适的荧光计测量荧光。Hoechst 33258[12] 和 PicoGreen[14,36] 对于 SDS 的灵敏度是不同的，在 DNA 测定中应该考虑到这些因素。Hoechst 染料检测法可耐受的 SDS 终浓度高达 0.02%，而 PicoGreen 则对超过 0.01%的 SDS 终浓度敏感 [见注意事项（5）]。这意味着高于这些极限浓度的任何细胞（或病毒）溶解步骤，必须在检测时进行稀释以达到一定的水平，这不难达到，可先进行细胞溶解，然后加入含荧光染料的无 SDS 缓冲液来完成，后者能同时适当地降低 SDS 的水平。带白边和透亮塑料或玻璃底的 96 孔板虽然可以在细胞的生长期对细胞进行观察，但定量检测步骤时要消除孔与孔间荧光的相互干扰（如 Nunc 96 Microwell，Packard Viewplate）。因此，应

将液体操作量减至最少并可实现自动化，从而达到很高的精密度和准确度。

2 材料

2.1 缓冲液配方

(1) 磷酸盐缓冲盐溶液（PBS-A，无Ca、Mg）。配制1 L：8 g NaCl，0.2 g KCl，2.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，0.24 g KH_2PO_4 和Milli-Q去离子水（Milli-Q "Biocet"或"synthesis"系统水，无核酸酶，18.2 MΩ · cm，Millipore Corporation）或者双蒸水900 ml，用浓盐酸将pH调整到7.4，用Milli-Q去离子水或者双蒸水补足到1000 ml。15 lb/in^2（psi）高压灭菌20 min后，室温储存。

(2) 枸橼酸钠盐溶液（SSC）。配制20× 的储存液1 L：175.3 g NaCl，88.2 g枸橼酸三钠，溶于Milli-Q去离子水或双蒸水800 ml。用数滴10 mol/L NaOH调pH到7.0，然后用Milli-Q去离子水或双蒸水定容至1000 ml。15 psi[①] 高压灭菌20 min。用无菌Milli-Q或双蒸水将5 ml稀释至100 ml（1∶20）供使用。

(3) Tris-EDTA缓冲液（TE）。10 mmol/L Tris-HCl，需要添加1 mmol/L EDTA。配制1 L：1.21 g Tris碱，0.372 g EDTA-Na_2，溶于Milli-Q去离子水或800 ml双蒸水，调pH到7.5，定容至1000 ml，15 psi高压灭菌20 min，4℃储存。

(4) 含EDTA（乙二胺四乙酸）的磷酸盐缓冲液。配制1 L：8 g NaCl，0.2 g KCl，2.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，0.24 g KH_2PO_4，0.2 g EDTA-Na_2，1.5 ml 5%酚磺酞，溶于Milli-Q去离子水或双蒸水900 ml，调pH到7.4，用Milli-Q去离子水或双蒸水补足到1000 ml，15 psi高压灭菌20 min。溶液应呈橙红色。

2.2 培养细胞的生长

(1) 配有无菌吸头的8通道或12通道或可重复使用的移液器。

(2) 无菌试剂槽，或方形培养皿。

(3) 培养瓶中的细胞［见注意事项（1）］。

(4) 多孔板（尽管多种读板器可以使用许多板型，典型的为96孔板）。

(5) 无钙、镁的PBS。

(6) 含EDTA的胰蛋白酶溶液。需要时配制新鲜的0.5～2.5 mg/ml胰蛋白酶溶液。用0.2 μm滤器过滤灭菌。已预灭菌的10× 胰蛋白酶浓缩液可以冻存在−20℃。

(7) 培养基，储存于4℃。

(8) 胎牛血清或者其他的血清，适宜的量分装后冻存，通常20～50 ml。

(9) 血细胞计数器，盖玻片，计数器。

(10) 倒置相差显微镜。

(11) 1000倍终浓度的生长促进剂或抑制剂，通常与载体蛋白如0.1%BSA［见注意事项（6）］一起配制，0.2 μm滤器过滤除菌，分装冰冻保存。如果体积太小不能预

① 1 psi=6.895 kPa。

先过滤除菌，那么可以在使用前对整个培养基进行除菌。用含胎牛血清或同样浓度的牛血清白蛋白的培养基预先浸湿过滤器，可将吸附于过滤器的已稀释多肽减至最少。小心地将液体从无菌过滤器的下部除去，以使对制剂的稀释降至最低。

（12）孵箱温度设置在 37℃，5%～10% CO_2 以适合所培养的细胞。

2.3 使用 PicoGreen 的 DNA 荧光检测法

（1）溶于蒸馏水的 10%SDS，室温保存［见注意事项（5）］。

（2）枸橼酸钠盐溶液（SSC）。

（3）用蒸馏水或 0.9%生理盐水配制的小牛胸腺 DNA 储存液（1 mg/ml）。4℃轻轻振荡过夜使其溶解，分装储存在－20℃。

（4）用含 0.02% SDS 的 SSC 临用时稀释 DNA 工作液，其浓度范围为 0～20 μg/ml。

（5）用 SSC 配制的 PicoGreen（或者 DAPI，Hoechst 33258 或 33342）储存液（1 mg/ml），避光分装储存在－20℃。应使用 SSC 配制稀释的工作液 0.8 μmol/L PicoGreen，或 0.1 μg/ml DAPI，或 0.1 μg/ml Hoechst。小心 DNA 嵌入性染料的可能致突变效应，在任何时间都应戴手套和避免气溶胶形成。

（6）配有合适滤光片装置（表 27.2）的荧光计（如 Cytofluor 4000；Perseptive Biosystems，Foster City，CA）。注意可以将某些光学传感器调整在多孔板的上面或下面进行检测。黑色和白色的多孔板只能从上面检测，透明的多孔板从上面和下面都可以检测。

3 方法

3.1 培养细胞的生长

这种测量方法如假定实验是用来测量细胞的生长，则每孔以低细胞数量开始。但是对生长抑制或细胞凋亡的研究来说，适宜使用一个较大的起始细胞数量。

（1）用于常规的传代培养，胰蛋白酶消化细胞（一般 2～5 min），再用含血清的培养基灭活胰蛋白酶，离心清洗细胞，100～150 *g* 室温离心 5 min，培养基重悬，取少量在血细胞计数器中计数。

（2）考虑到整个实验的需要，可取适当数量的细胞（由于吸取量可能会有误差，允许适度的过量）重悬成 10^4 个/ml，如果使用 96 孔板则每孔可加入 100 μl（1000 个细胞）。在这一操作步骤中，充分混匀细胞和分配等量体积是每孔获得一致细胞数量的关键。调整细胞数以达到你的特殊需求或已知生长率［见注意事项（1）］。对于细胞毒性检测来说，需要高的起始细胞数量，这是因为在检测过程中会有很多细胞丢失在培养的上清液中。可轻柔振摇和用吸管吸出收集这些细胞做进一步检测。然而 DNA 的估算方法可能并不适合于检测细胞凋亡，而应该考虑 TUNEL[37] 或锚定蛋白 V-生物素[38] 检测法。这种初始的培养通常可在 96 孔板中达到 10^5 个细胞。接种细胞时血清往往要达到 10%的浓度以便细胞有效地黏附和扩展，然而这一浓度也是可以更改的；通常在 24 h 时，可将培养基转换为低浓度血清。每个时间点用不同的培养板以适应不同时间点的

要求。

(3) 在细胞扩展后，就可以酚情取代实验的培养基直到作为阳性对照组的细胞刚要铺满前，或者对 96 孔板来说达到每孔约 10^5 的最大量［见注意事项 (6)］。

(4) 细胞收集：在每个时间点，在低吸力下从每孔里小心地吸取培养基。为了方便起见可用 8 通道的多管移液器（即 Nunc Immuno Washers)，将培养板保持在一个较高的角度（达到 60°）以确保完全吸取。应避免多管移液器或吸量管与单层细胞接触。低吸力对培养细胞的破坏较少。如果是非黏附性细胞可用 V 形底培养板，并在吸取培养基前在 200 *g* 离心培养板。对于检测脱落或凋亡的细胞来说，可用 8 或 12 通道的移液器将它们定量转移到 V 形底培养板，并用 PBS-A（或其他适当的缓冲液）洗涤每孔，至少更换洗液一次。然后将这些合并，像对待非贴壁细胞那样进行离心，所产生的细胞沉淀物可用于 DNA 检测和（或）角质化包膜检测[1]。在贴壁细胞检测的结束阶段，无菌操作并不重要，可用“轻轻拂去”的方法（快速反转培养板）除去培养基，然后在吸水纸上将培养板吸干。如果用后一种方法，注意要戴上手套，不要制造可能含有毒物质和细胞或碎片的气溶胶。

(5) 用 PBS-A 洗涤每孔两次，吸出并保存于 −20℃，直至 DNA 检测。冷冻步骤的好处在于解冻时可使大多数细胞破裂，从而提高了后续细胞溶解步骤的效果［见注意事项 (7)］。

3.2 使用 PicoGreen 的 DNA 荧光检测[12,14,36]

(1) 用含有 0.02%SDS 的 SSC 将 DNA 储存液稀释到工作浓度（0～20 μg/ml)。PicoGreen 稀释所用的 SDS 若浓度更大则产生很强的背景荧光。吸取 100 μl 加入到新培养板或者实验板的多余孔内，一式 4 孔。避免产生气泡，因为在荧光检测时气泡可作为镜片/散射体，导致异常的结果。“反向”吸液是一个有用的方法，可使用 Gilson 或等同的移液器达到此目的，电子多通道移液器通常能避免气泡的形成，并且转移液体的体积，更具可重复性。

(2) 每一实验孔中加入 100 μl 含 0.02% SDS 的 SSC 以溶解细胞。更高浓度的 SDS 可用于溶解较多的细胞。然而，在荧光计进行读数时，加入染料后的 SDS 终浓度应为 0.01%或更低。对于 96 孔板来说，每孔的最大工作体积大约是 280 μl。就纤维性细胞而言，若分层的表皮或牙龈角质形成细胞，有必要在溶解缓冲液中包含 8 mol/L 的尿素。在加入 PicoGreen 后的尿素终浓度应为 2 mol/L[14]，并且在细胞计数时应计算稀释倍数［见注意事项 (7)］。

(3) 在一个旋转振荡器上，37℃孵育 30 min，以确保细胞溶解。

(4) 将 PicoGreen 储存液以 1∶200 倍稀释在 SSC 中，每孔加入 100 μl。在操作可能致突变的 DNA 结合染料时，戴上手套并避免产生气溶胶。

(5) 避光条件下轻柔转动 96 孔板 5 min，以便混合和稳定染料-DNA 复合物。此时可在透明的 96 孔板上读取荧光，但为了提高灵敏度，从每孔中取出 180 μl（或细胞或标准溶液的其他已知部分）到一个白色的 96 孔板里。

(6) 在微量板荧光计数器上读取每个样品的荧光值，激发 (ex) 光波长 (λ) 为 502 nm，发射 (em) 光波长 λ 为 523 nm，或使用荧光滤光片装置（λ_{ex} = 494 nm，

$\lambda_{em}=518$ nm)，这能满足大多数实验的需要。减去空白对照的读数可获得 DNA 特异性的荧光信号，绘制标准曲线图以检查其线性度，从标准曲线的斜率计算未知值。斜率的 R^2 应趋于一致。

4 注意事项

（1）这种方法应该有助于许多类型细胞增长率的测定。荧光单位与 DNA 含量的回归确实趋于一致。这种方法可与荧光的酶联免疫吸附试验（ELISA）结合，平行地进行测定，用于检测细胞抗原，可以同时建立几种参数之间的相互关系。

（2）一个需进一步考虑的因素是细胞的倍性水平，它能够确切地影响 DNA 的数值，但是也可能混淆真实细胞数量的计算。针对 DNA 标准曲线，进行已知细胞数的 PicoGreen 荧光滴定，可计算出每个细胞的平均 DNA 含量。正常人二倍体细胞包含约 7 pg 的总 DNA[39]，但其中 2 pg 可能来自线粒体。相差显微镜观检查细胞可显示有多少细胞是多核的，当用 PicoGreen、DAPI 或 Hoechst 染料对细胞核染色做荧光显微镜观察时，更亮的影像显示为多倍体细胞。细胞的流式细胞计量术能对整个细胞群体提供一个统计学上的数据。这是很有用的，特别是对肝细胞来说，它常常有一个以上的细胞核，且每个胞核又有不同拷贝数的基因组，尤其是小鼠。最近已可见到关于不同组织[5,6]或癌症[7]中染色体倍数怎样变化的综述。对于表皮角质形成细胞来说，染色体的倍性通常不是问题，然而研究人员应该想到这点，来监测伴有 DNA 含量已急剧减少的脱屑角质化包膜。

（3）这里所描述的这种方法可能适用于异染色性的吖啶橙来同时估算 DNA 和 RNA，选择合适的波长（对于 DNA 来说，$\lambda_{ex}=485$ nm，$\lambda_{em}=530$ nm；对于 RNA 来说，$\lambda_{ex}=485$ nm，$\lambda_{em}=620$ nm）。然而这种染料的核酸灵敏度较低。溴化乙锭也可以和 DNA 与 RNA 两者结合，但不是异染性的，若进行特异性 DNA 检测还需要额外的一步，就是用 RNA 酶去除 RNA[40,41]。这两种 Hoechst（33258，33342）染料和 DAPI 都与 AT 碱基对结合，而 PicoGreen 既与富含 CG 的 DNA 结合，也等量地与富含 AT 的 DNA 结合。虽然这 4 种染料对 DNA 有明显的特异性，但它们对 RNA 和单链 DNA 也有很低的荧光信号[14]。然而，在细胞短时间暴露于溴脱氧尿苷（BrdU）中以检测细胞合成 DNA 的时候，这种胸腺嘧啶类似物可抑制 Hoechst 和 DAPI 与 DNA 的结合，并导致 DNA 含量的低估[42]。对于 PicoGreen 来说结果是否也如此，目前尚无报道。

（4）评估细胞的氚化脱氧胸腺嘧啶核苷（[^{3}H]-TdR）掺入，不会影响到 DNA 的荧光检测。但应注意它的潜在危害和在实验上的难题[43]。细胞在收集前接受 1～4 h 的 37 kBq（1 μCi)/ml [^{3}H]-甲基-脱氧胸腺嘧啶核苷（比活性为 5 GBq/mmol)，用 PBS-A 洗涤三次以去除未掺入的标记物，接着进行上述的 DNA 荧光检测。在读取荧光值后，用闪烁（能）谱法测定一个等分量的消化细胞，其测量值与相同孔内所测得的 DNA 微克量相关。然而，这种方法未考虑存在于细胞内、可用酸抽提的未掺入或储存的标记物，因此会过高估计 [^{3}H]-甲基-胸腺嘧啶脱氧核苷的掺入。最好用 5%三氯乙酸（TCA）沉淀一个等分量消化细胞中的 DNA 后，再测量其中的胸腺嘧啶脱氧核苷，但是那就意味着每孔需要更多的步骤，或者需要一个平行测定板[4]。用^{3}H-TdR 测定时

的另一个重要缺点是只有合成DNA的细胞才摄取标记物，这不能反映所有培养细胞的行为。鼓励研究者阅读有关［^{3}H］-胸腺嘧啶脱氧核苷检测法的陈旧而仍然中肯的评论[43~45]。

（5）为了达到最高的灵敏度，SDS在溶解缓冲液中的终浓度在加入PicoGreen后不能超过0.01%，若是Hoechst染料或DAPI则不能超过0.02%。其他溶解剂，如NaOH、EDTA、TritonX-100、NP-40，或者较高浓度的SDS是不可靠的，会出现很高的空白试验数值和较低的灵敏度[12,14,36]。应该用与未知样本相同的方法处理DNA标准品。为这一方法推荐的所有荧光染料一旦加入就会立即结合DNA，如果避光的话则很少随时间而变化。尽管如此，在加入染料后，仍是在规定时间内读取荧光值是谨慎而可取的，如此可以提高实验与实验之间的可比性。

（6）细胞在体外的生长通常依赖于血清，所以有关促生长因子的研究需要建立对血清的剂量反应，除非所研究细胞的无血清培养条件为已知。0.1%～10%的血清浓度对大多数类型的细胞来说是足够的。1%的血清能让细胞缓慢生长超过7 d的时间，在这样的基线上可加入生长因子或者抑制剂。大多数细胞在培养后和对数生长期前有一个1～2 d的“延滞期”。如果是检测未知的因子，通常要在基础生长培养基中包含一种已知促生长因子（表皮生长因子或者几种因子的混合物）作为阳性对照。这将显示细胞仍然保持对一种已知试剂的反应。同样有用的是，包括一个在10%～20%血清中的培养细胞以显示最快的生长。对于生长抑制因子来说，需要考虑细胞急剧增殖的条件，然后评价细胞在一段时程的缓慢生长。

（7）在完成了带有数个时间点的细胞生长曲线后，通常可将已清洗和吸去培养液的样品储存在－20℃待测。这样不会导致DNA的丢失，解冻后细胞溶解所释放的核酶较强地被SSC缓冲液中的枸橼酸盐所抑制，而TE缓冲液中EDTA的抑制作用较轻[46]。在实验板上保留一排孔不用，这样可能会便于检测DNA时用于加入DNA标准品。这一检测法非常适合于小细胞含量的样本，其灵敏度在±50个细胞左右，96孔板能让细胞在相同的位置生长和进行分析。如果使用培养瓶，关键是在吸取样品到96孔板检测DNA时应确保将已溶解细胞的混合物完全混匀，当然较大的体积更适合荧光计比色杯的大小（2 ml）。对96孔板溶解缓冲液适合的最小体积为每孔50 μl，或24孔板每孔250 μl，或6孔板每孔2 ml。用这种方法检测结肠直肠或乳腺癌细胞系和成纤维细胞的结果是一致的。当检测复层角质形成细胞的培养物，或过度铺满的其他类型细胞时，初始的溶解体积和（或）SDS浓度（%）应该加倍以保证细胞的完全溶解。当然加入8 mol/L的尿素可使SSC对角质形成细胞的溶解作用最好，但用PicoGreen时应将尿素稀释到2 mol/L。样品的无气泡混匀也是非常重要的，以避免光学仪器所探测的荧光信号失真。在这种情况下，“反向”吸液是非常有用的。如果使用Hoechst或DAPI，染料浓度应该升高到4 μg/ml，以适应超过10 μg/ml的DNA水平。用Hoechst或DAPI的检测比用PicoGreen的检测所受尿素浓度的影响更少。

（蒋丽莉　王丽华 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Rice, R. H. (1994) Assays for involucrin, transglutaminase and ionophore-inducible envelopes, in *The Kerati-*

nocyte Handbook (Leigh, I. M. and Watt, F. M. E., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 157—165.

[2] Takahashi, H., Ibe, M., Kinouchi, M., Ishida-Yamamoto, A., Hashimoto, Y., and Iizuka, H. (2003) Similarly potent action of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues, tacalcitol, calcipotriol, and maxacalcitol on normal human keratinocyte proliferation and differentia tion. *J. Dermatol. Sci.* **31**, 21—28.

[3] Otto, W. R. (1993) Assays in cell proliferation, in *Cell and Tissue Culture: LaboratoryProcedures* (Doyle, A., Griffiths, J. B., and Newell, D. G. E., eds.), John Wiley, Chichester, UK, pp. 10E11. 11—10E11. 15.

[4] Otto, W. R. (1993) Fluorimetric and spectrophotometric measures of cell number, in *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (Doyle, A., Griffiths, J. B., and Newell, D. G. E., eds.), John Wiley, Chichester, UK, pp. 4B2. 1—4B2. 10.

[5] Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J. M., and Jones, M. R. (2002) Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell Physiol.* **190**, 7—20.

[6] Gupta, S. (2000) Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 161—171.

[7] Duesberg, P. and Rasnick, D. (2000) Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* **47**, 81—107.

[8] Bachoon, D. S., Otero, E., and Hodson, R. E. (2001) Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization. *J. Microbiol. Methods* **47**, 73—82.

[9] Cosa, G., Focsaneanu, K. S., McLean, J. R., McNamee, J. P., and Scaiano, J. C. (2001) Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single-and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochem. Photobiol.* **73**, 585—599.

[10] McGowan, K. B., Kurtis, M. S., Lottman, L. M., Watson, D., and Sah, R. L. (2002) Biochemical quantification of DNA in human articular and septal cartilage using PicoGreen and Hoechst 33258. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 580—587.

[11] Papadimitriou, E. and Lelkes, P. I. (1993) Measurement of cell numbers in microtiter culture plates using the fluorescent dye Hoechst 33258. *J. Immunol. Methods* **162**, 41—45.

[12] Rao, J. and Otto, W. R. (1992) Fluorimetric DNA assay for cell growth estimation. *Anal. Biochem.* **207**, 186—192.

[13] Rengarajan, K., Cristol, S. M., Mehta, M., and Nickerson, J. M. (2002) Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Mol. Vis.* **8**, 416—421.

[14] Singer, V. L., Jones, L. J., Yue, S. T., and Haugland, R. P. (1997) Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for doublestranded DNA quantitation. *Anal. Biochem.* **249**, 228—238.

[15] Belkacemi, Y., Piel, G., Rat, P., Julia, F., Touboul, E., Housset, M., and Warnet, J. M. (2000) Ionizing radiation-induced death in bovine lens epithelial cells: mechanisms and influence of irradiation dose rate. *Int. J. Cancer* **90**, 138—144.

[16] Blaheta, R. A., Kronenberger, B., Woitaschek, D., Weber, S., Scholz, M., Schuldes, H., et al. (1998) Development of an ultrasensitive in vitro assay to monitor growth of primary cell cultures with reduced mitotic activity. *J. Immunol. Methods* **211**, 159—169.

[17] Richards, W. L., Song, M. K., Krutzsch, H., Evarts, R. P., Marsden, E., and Thorgeirsson, S. S. (1985) Measurement of cell proliferation in microculture using Hoechst 33342 for the rapid semiautomated microfluorimetric determination of chromatin DNA. *Exp. Cell Res.* **159**, 235—246.

[18] Hukkelhoven, M. W., Vromans, E., Markslag, A. M., and Vermorken, A. J. (1981) A simple fluorimetric microassay for DNA in hair follicles or fractions of hair follicles. *Anticancer Res.* **1**, 341—344.

[19] Serth, J., Kuczyk, M. A., Paeslack, U., Lichtinghagen, R., and Jonas, U. (2000) Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *Am. J. Pathol.* **156**, 1189—1196.

[20] Lindstrom, E. S., Weisse, T., and Stadler, P. (2002) Enumeration of small ciliates in culture by flow cytometry and nucleic acid staining. *J. Microbiol. Methods* **49**, 173—182.

[21] Markovits, J., Roques, B. P., and Le Pecq, J. B. (1979) Ethidium dimer: a new reagent for the fluorimetric determination of nucleic acids. *Anal. Biochem.* **94**, 259—264.

[22] Royce, P. M. and Lowther, D. A. (1979) Fluorimetric determination of DNA in papain digests of cartilage, using ethidium bromide. *Connect. Tissue Res.* **6**, 215—221.

[23] Li, D. H., Chen, X. L., Fang, Y., and Xu, J. G. (2001) Determination of nucleic acids based on shifting the association equilibrium between tetrasulfonated aluminium phthalocyanine and acridine orange. *Analyst* **126**, 518—522.

[24] Haugland, R. P. (2002) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th ed. Molecular Probes, Eugene, OR.

[25] Jones, L. J., Yue, S. T., Cheung, C. Y., and Singer, V. L. (1998) RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: riboGreen reagent characterization. *Anal. Biochem.* **265**, 368—374.

[26] Monpoeho, S., Dehee, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J. C., et al. (2000) Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube realtime RT-PCR. *Biotechniques* **29**, 88—93.

[27] Larson, E. J., Hakovirta, J. R., Cai, H., Jett, J. H., Burde, S., Keller, R. A., et al. (2000) Rapid DNA fingerprinting of pathogens by flow cytometry. *Cytometry* **41**, 203—208.

[28] Gilbert, R. L., Rider, J. R., Turton, J. R., and Pamphilon, D. H. (2003) Detection of residual donor leucocytes in leucoreduced red blood cell components using a florescence microplate assay. *J. Immunol. Methods* **274**, 17—25.

[29] Romppanen, E. L., Savolainen, K., and Mononen, I. (2000) Optimal use of the fluorescent PicoGreen dye for quantitative analysis of amplified polymerase chain reaction products on microplate. *Anal. Biochem.* **279**, 111—114.

[30] Gelmini, S., Caldini, A., Becherini, L., Capaccioli, S., Pazzagli, M., and Orlando, C. (1998) Rapid, quantitative nonisotopic assay for telomerase activity in human tumors. *Clin. Chem.* **44**, 2133—2138.

[31] Elmendorff-Dreikorn, K., Chauvin, C., Slor, H., Kutzner, J., Batel, R., Muller, W. E., et al. (1999) Assessment of DNA damage and repair in human peripheral blood mononuclear cells using a novel DNA unwinding technique. *Cell Mol. Biol.* (*Noisy-le-grand*) **45**, 211—218.

[32] Choi, S. J. and Szoka, F. C. (2000) Fluorometric determination of deoxyribonuclease I activity with PicoGreen. *Anal. Biochem.* **281**, 95—97.

[33] Chang, C. P., Chia, R. H., Wu, T. L., Tsao, K. C., Sun, C. F., and Wu, J. T. (2003) Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta* **327**, 95—101.

[34] Jiang, N., Reich, C. F., Monestier, M., and Pisetsky, D. S. (2003) The expression of plasma nucleosomes in mice undergoing in vivo apoptosis. *Clin. Immunol.* **106**, 139—147.

[35] Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L., and Fernandes, J. C. (2003) Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* **24**, 1255—1264.

[36] Murakami, P. and McCaman, M. T. (1999) Quantitation of adenovirus DNA and virus particles with the PicoGreen fluorescent dye. *Anal. Biochem.* **274**, 283—288.

[37] Li, C., Issa, R., Kumar, P., Hampson, I. N., Lopez-Novoa, J. M., Bernabeu, C., et al. (2003) CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J. Cell Sci.* **116**, 2677—2685.

[38] Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van Oers, M. H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415—1420.

[39] Johnson-Wint, B. and Hollis, S. (1982) A rapid in situ deoxyribonucleic acid assay for determining cell number in culture and tissue. *Anal. Biochem.* **122**, 338—344.

[40] Karsten, U. and Wollenberger, A. (1977) Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. *Anal. Biochem.* **77**, 464—470.

[41] Otto, W. R., Barr, R. M., Dowd, P. M., Wright, N. A., and Greaves, M. W. (1989) 12-Hy droxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid (12-HETE) does not stimulate proliferation of human neonatal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 683—688.

[42] Latt, S. A. and Stetten, G. (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 24—33.

[43] Dover, R. (1992) Basic methods for assessing cellular proliferation, in *Cell Proliferation in Clinical Practice* (Hall, P. A., Levison, D. A., and Wright, N. A., eds.), Springer-Verlag, London.

[44] Maurer, H. R. (1981). Potential pitfalls of [3H] thymidine techniques to measure cell proliferation. *Cell Tissue Kinet.* **14**, 111—120.

[45] Wright, N. A. and Alison, M. (1984) *The Biology of Epithelial Cell Populations*, Vol. 1, Oxford University Press, Oxford, pp. 97—196 and 223—246.

[46] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vol. 3, 3 vols, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p. Appendix E5.

[47] Burton, K. (1956) A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**, 315—323.

第28章 角质形成细胞的瞬时转染技术

Anthony M. Flores，Brian J. Aneskievich

摘 要：本章节旨在为读者提供简单易行、适于原代和传代角质形成细胞的瞬时转染技术指南。其重点是强调技术的可行性、低成本和可重复性，并可根据实验规模、实验条件、样本量进行调整。此外，还提供了达到良好转染效果所必需的细胞培养基本技术。虽然此方法专用于角质形成细胞，但这些技术还可用于单纯的上皮细胞系和实验室常用的细胞系，如 COS-7 和 CV-1。标准化的磷酸钙共沉淀转染方法适于多种实验设计，多聚-L-鸟氨酸方法适于不能用钙离子介导的转染试验。拓展的注意事项部分提供了必要的操作细节，一方面指导初学者，另一方面提醒有经验的研究人员，成功的实验操作有赖于一些定量定性的因素，包括启动子强度、细胞培养技术和质粒的分离

关键词：磷酸钙；多聚 L-鸟氨酸；永生化角质形成细胞系（HaCaT）；鳞状细胞癌（SCC）；受体质粒

1 导言

基因转染角质形成细胞技术的发展使我们进一步有机会在转录水平上阐明表皮细胞生长、生理和分化的调控机制。瞬时转染的特征就是没有压力筛选，不能清除未被转染的细胞，因而导致报告信号被稀释。所以近年的研究强调提高质粒导入细胞的有效率及报告基因表达检测的敏感性。生物基因载体如逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒载体，已成功用于角质形成细胞株和连续细胞系[1]。但是，生物安全性问题和需要分离滴定重组病毒限制了其在常规瞬时转染上的广泛应用。电穿孔法虽然转染效率高，但设备昂贵。

目前商品化脂质 DNA 载体已广泛用于角质形成细胞和非角质形成细胞[2]的细胞培养与原位组织的导入。也有人已经总结了脂质体复合物的自行制备技术[3]，但可能由于脂质制备过程存在一定可变性而需要额外的质量监控，导致该技术的应用有限。使用商品化的脂质转染试剂盒结果比较稳定但花费昂贵。这些技术常被文献引用，但对于脂质或阳离子转染方法是否适用于角质形成细胞原代和（或）传代细胞系的瞬时转染，目前尚未达成共识。这也和我们以往的经验相符，我们发现在传代的角质形成细胞系之间脂质载体很难有相似的转染效率。

有趣的是，近期有文献综述提示相对于稳定转染而言，磷酸钙共沉淀法仍常用于瞬时传染，特别是在转染大量细胞、含强大的角质形成细胞特异性启动子或应用更敏感探测系统的时候。我们提供的实验方案反映了此内容，也包括一种有效的多聚 L-鸟氨酸转染方法[4]，该备选方法不需要钙离子介导。虽然萤光素酶报告基因已被普

遍应用，但有许多实验室用CAT作为报告基因，本方案就适用于该体系[5]。这里强调的许多细胞培养和转染方法很容易应用该系统。但对于一些商品化探测系统的操作流程包括CAT和萤光素酶的表达检测这里不再详述，我们主要讲述检测细胞裂解产物中作为转染内参照的β-半乳糖苷酶报告基因表达的方法。最后，我们指出目前没有一个标准的实验方案能满足所有的实验需求，但通过优化调节细胞密度、质粒DNA与细胞接触时间、转染后孵育时间这些实验技术，能适用于不同类型的细胞或实验，所以我们还介绍了一种操作方便的β-半乳糖苷酶活性原位染色技术来测定转染效率，以便于优化转染程序。

2 材料

2.1 细胞培养基和磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）

（1）角质形成细胞生长培养基（kerationcyte growth media，KGM）：由Cambrex（Clonetics）公司提供，按照说明书操作使用。

（2）含血清的角质形成细胞培养基：Dulbecco改进的Eagle培养基（DMEM，Invitrogen，cat. no. 12100-038），三袋1 L的包装，高糖，含L-谷氨酰胺和盐酸吡哆醇①，不含丙酮酸钠和碳酸氢钠；含L-谷氨酰胺、不含碳酸氢钠的F12（Ham）培养基（Invitrogen，cat. no. 21700-026）；12.28 g碳酸氢钠（Sigma，cat. no. S5761）。将粉状培养基缓慢加于3.6 L高质量水中［见注意事项（1）］，完全溶解后加入碳酸氢钠，用薄膜覆盖，搅动40 min到1 h。pH滴定至7.1后，立即过滤除菌。旋紧瓶盖后4℃避光保存。使用时添加终浓度分别为100 U/ml和100 μg/ml的青霉素-链霉素（Invitrogen，cat. no. 15140-122），以及终浓度为10%的胎牛血清（已经过筛选，最适于角质形成细胞生长）［见注意事项（2）］。

（3）1× PBS：依次缓慢加入4.31 mmol/L Na_2HPO_4，1.47 mmol/L KH_2PO_4，2.68 mmol/L KCl，137 mmol/L NaCl。每加入一种成分，应完全溶解后再加入下一种成分。调至最终体积，彻底混匀。等量分装至500 ml瓶中，高压消毒25 min。

（4）胰蛋白酶：在PBS中加入0.1%胰蛋白酶、0.1%葡萄糖、0.02%乙二胺四乙酸（EDTA）、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素。

2.2 标准的磷酸钙共沉淀方法［见注意事项（1）］

（1）2× HEPES缓冲盐溶液（HBS，250 ml）：50 mmol/L *N*-2-羟乙基哌嗪-*N*′-2-乙磺酸（HEPES），280 mmol/L NaCl，1.5 mmol/L Na_2HPO_4。依次溶于无致热原水［见注意事项（1）］，终溶液pH调节至7.05［见注意事项（3）］。用Nalgene过滤器（孔径为0.2 μm）过滤除菌，根据实验需求分装，通常5～10 ml，保存于−20℃，解冻后需充分混匀。

（2）5× $CaCl_2$（100 mL）：1.25 mol/L二水合氯化钙。在搅拌的水中缓慢加入氯

① 原文pyroxidine HCl有误，应为pyridoxine HCl。——译者注

化钙，完全溶解后调至终容量。用 Nalgene 过滤器（孔径为 0.2 μm）过滤除菌，根据实验需求分装，通常 1～2 ml，保存于－20℃，解冻后需充分混匀。

（3）微量离心机（Fisher，cat. no. 05-090-124）或相近产品。

2.3 低 CO_2 磷酸钙共沉淀转染

（1）2× BBS-BES 缓冲盐溶液（250 ml）：50 mmol/L *N*，*N*-双（2-羟乙基）-2-氨基乙磺酸（BES）（Sigma，cat. no. B4554），280 mmol/L NaCl，1.5 mmol/L 无水 Na_2HPO_4。依次溶于无热源水中［见注意事项（1）］，调整终溶液的 pH 至 6.95［见注意事项（3）］。用 Nalgene 过滤器（孔径为 0.2 μm）过滤除菌，根据实验需求分装，通常 5～10 ml，保存于－20℃，解冻后需充分混匀。

（2）10× $CaCl_2$（50 ml）：2.5 mol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$。向搅拌的水中缓慢加入氯化钙。完全溶解后，配到终容量。用 Nalgene 过滤器（孔径为 0.2 μm）过滤除菌，根据实验需求分装，通常 1～2 ml，保存于－20℃，解冻后需充分混匀。

2.4 多聚 L-鸟氨酸介导的转染方法

（1）多聚 L-鸟氨酸储存液（PLO，10 ml）：无菌条件下，从未开封的瓶中取 100 mg多聚 L-鸟氨酸（Sigma，cat. no. P3655）放入 50 ml 消毒试管中（必要时用高压消毒过的药匙），加 10 ml 无菌水，倒转振荡混匀，配成 10 mg/ml 无菌溶液，1 ml 分装保存于 4℃。

（2）细胞培养级的 DMSO（Sigma，cat. no. D2650），或相近的产品。

2.5 ONPG 法检测 β-半乳糖苷酶（β-gal）的缓冲液和底物

（1）250 ml Z-缓冲液：60 mmol/L Na_2HPO_4，40 mmol/L NaH_2PO_4，10 mmol/L KCl，1 mmol/L $MgSO_4$，pH 调至 7.0。检测时新鲜加入 β-巯基乙醇至终浓度 50 nmol/L（2.7 μl/ml 缓冲液）。

（2）4 mg/ml 邻-硝基苯-β-D-半乳糖苷（ONPG，Sigma，cat. no. N1127）。溶解于 Z-缓冲液，分装保存于－20℃。

（3）终止溶液 1 mol/L Na_2CO_3（10.6 g 溶于水至终容量为 100 ml）。

2.6 CRPG 法检测 β-gal 的缓冲液和底物

（1）含 160 mmol/L 磷酸钠的 2× CRPG 检测缓冲液（100 ml）：磷酸盐储存溶液（7.07 ml 1 mol/L Na_2HPO_4加 2.63 ml 1 mol/L NaH_2PO_4）与水混合至 90 ml 左右，调节 pH 7.3，然后定容到 96.8 ml。使用时加入 $MgCl_2$和 β-巯基乙醇（见 3.6）。

（2）20 mmol/L 氯酚-红色-β-D-半乳糖苷一钠盐（chlorophenol red-β-D-galacto pyranoside monosodium salt，CRPG，Roche，cat. no. 84 308.）：250 mg 溶于 20.58 ml 水中，分装保存于－20℃。

2.7 β-gal 原位染色

（1）β-gal 原位染色液（100 ml）：100 ml PBS 中加入 0.1646 g 铁氰化钾（Sigma，

cat. no. P8131)、0.2112 g 亚铁氰化钾（Sigma，cat. no. P9387)、200 μl 1 mol/L $MgCl_2$、20 μl NP-40（Sigma，cat. no. I8896）和 0.01 g 脱氧胆酸钠。

（2）5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷（X-gal）：X-gal（Sigma，cat. no. B4252 或相近产品）溶于二甲基甲酰胺（DMF），储存液的浓度为 20 mg/ml，置于用箔薄片包裹的玻璃容器中（非塑料容器），−20℃状态下可保存近三个月。

3 方法

3.1 储备细胞的维持和转染细胞的制备

（1）用含 0.02% EDTA 的 PBS 清洗直径 100 mm 的培养皿和培养板［见注意事项（4）］，用于传代转染细胞［见注意事项（6）］。

（2）加入含 0.02% EDTA 的 PBS 8～10 ml，37℃孵育 5～7 min［见注意事项（4）］。

（3）吸去清洗液，用 2 ml 新鲜解冻的胰蛋白酶消化细胞，约 5 min。

（4）加入 8 ml 含血清的培养液，反复吹散重悬细胞，并对细胞悬液或其稀释液进行细胞计数，推测下一步的完全回收率。

（5）200 g 离心细胞 5 min。

（6）吸弃含胰蛋白酶/培养基的上清液，加入 10 ml 含血清的培养基重悬细胞并反复吹打，再用含更多血清的培养基［见注意事项（5）］进一步稀释细胞，按表 28.1 的细胞浓度接种于培养瓶（表 28.1）。

表 28.1 转染细胞接种密度

细胞类型	培养器皿/容量	细胞数目
原代角质形成细胞	6 孔板每孔/3 ml	5.0×10^5
原代角质形成细胞	60 mm 培养皿/5 ml	9.0×10^5
HaCaT	12 孔板每孔/2 ml	1.1×10^5
HaCaT	6 孔板每孔/3 ml	2.5×10^5
HaCaT	60 mm 培养皿/5 ml	6.6×10^5
SCC13	12 孔板每孔/2 ml	0.6×10^5
SCC13	6 孔板每孔/3 ml	1.1×10^5
SCC13	60 mm 培养皿/5 ml	2.1×10^5

（7）一般接种 18～24 h 后进行转染［见注意事项（6）］，但有些连续细胞系需要更多的时间铺展和达到旺盛的生长状态。鳞状细胞癌细胞系 13（SCC13）一般低密度接种，需要培养 48 h。

3.2 标准的磷酸钙共沉淀

每一种转染混合物（表 28.2）都需要准备一个标记的无菌聚丙烯离心管（Falcon 2059）和一个相应标记的 1.5 ml 微量离心管［见注意事项（7）］。

表 28.2 标准磷酸钙共沉淀法的试剂制备

成分	6 孔板每孔加样量	12 孔板每孔加样量
无菌水	120 μl 减去 X μl	80 μl 减去 Y μl
质粒 DNA	X μl 中共含 3.0～3.5 μg	Y μl 中共含 1.2～1.4 μg
1.25 mol/L $CaCl_2$	30 μl	20 μl
2× HBS	150 μl	100 μl

（1）在无菌 1.5 ml 微量离心管［见注意事项（9）］中加入水和 DNA［见注意事项（8）］，轻敲混匀并加入 1.25 mol/L $CaCl_2$，涡旋振荡 2～3 s，然后在微量离心机中旋转约 10 s，使所有的液体沉至管底。

（2）每个 Falcon 管中加入一定量的 2 × HBS，然后置于涡旋混合器的泡沫聚丙乙烯固定容器具中［见注意事项（10）］。混合器需设定恒定的最低速度。缓慢地将 DNA/$CaCl_2$/H_2O 混合物滴入 2× HBS 中。DNA 的加入速度至关重要，用移液器逐滴加入，两滴之间间隔 1～2 s。

（3）盖紧 Falcon 管，20 min 后形成细小、肉眼可见的白色沉淀物。由于大量沉淀混合物的产生需要几分钟的时间，我们一般对每个 Falcon 管分别进行时间标记，以保证每个混合物加入细胞前的时间一致，均为 20 min。

（4）涡旋振荡重悬沉淀后立即将沉淀滴加在培养板/孔内培养基的表面，培养板/孔经 8 字状摇晃 2～3 次后立即放入培养箱中孵育 14～16 h［见注意事项（11）］。

（5）孵育过夜后检查并记录细胞培养及沉淀状况［见注意事项（12）］。在后续休克步骤中，延长细胞暴露于沉淀的过夜时间，未发现细胞转染效率有明显增加［见注意事项（13）］。轻晃培养板/孔并吸弃培养基和沉淀混合物，用室温 PBS 洗细胞两次，加入预温的含血清培养基或按实验所需添加其他成分的培养基。由于我们的实验涉及核受体的活化，配体降解较细胞代谢消耗的培养基更受到关注［见注意事项（6）］，故孵育 24 h后，即再次更换培养基。转染后的总时间一般为 60～65 h。

（6）根据所选择的报告基因载体系统收集细胞。

3.3 低 CO_2 磷酸钙共沉淀

（1）按表 28.3 混合 H_2O 和 $CaCl_2$ 于 Falcon 2059 管中，轻敲混匀，加入质粒 DNA［见注意事项（8）］，涡旋振荡 2～3 s，直接加入 2× BBS，这是因为与标准的磷酸钙共沉淀不同，DNA 加入的速度似乎不影响转染效率。

表 28.3 低 CO_2 磷酸钙共沉淀转染方法的试剂制备

成分	6 孔培养板每孔加样量	12 孔培养板每孔加样量
无菌水	135 μl 减去 X μl	90 μl 减去 Y μl
2.5 mol/L $CaCl_2$	15 μl	10 μl
DNA 质粒	X μl 中共含 3.5 μg	Y μl 中共含 1.4 μg
2× BBS	150 μl	100 μl

(2) 盖紧 Falcon 管，20 min 后形成沉淀。各管时间必须一致。和标准磷酸钙共沉淀方法不同的是，这段时间里形成的沉淀非肉眼可见[6]。

(3) 涡旋振荡转染混合物重悬沉淀，而后立即将沉淀滴加在培养板/孔内培养基的表面。培养板/孔经 8 字状摇晃 2～3 次后立即放入 3% CO_2 培养箱中孵育 14～16 h［见注意事项 (11)］。

(4) 过夜孵育后检查和记录细胞培养及沉淀状况［见注意事项 (12)］。细胞表面和培养板/孔的无细胞区域可见细小、色暗的沉淀物。轻晃培养板/孔，吸弃培养液和沉淀的混合物。用室温 PBS 清洗细胞两次，加入预加温的含血清培养基或按实验所需添加其他成分的培养基。转染后的总时间一般为 48～65 h。

(5) 根据所选择的报告基因载体系统收集细胞。

3.4 多聚 L-鸟氨酸介导的转染方法［见注意事项 (14)］

(1) 检查并记录细胞汇合的大致百分率。加温无血清培养基和 PBS 到 37℃，按注意事项 (8) 的方法制备质粒/PLO/培养基混合物。配制表 28.4 中的各种成分，每个试验条件转染至少两次。轻轻上下翻转彻底混匀培养基/DNA/PLO 混合物。鉴于操作流程中会有液体损失，转染混合物的配制一般需要额外多估一个板/孔的量。

表 28.4 PLO 介导的转染方法的试剂制备

成分	直径 60 mm 培养皿加样量	6 孔培养板每孔加样量
KGM 基础培养基	1.8 ml 减去 X μl	810 μl 减去 Y μl
质粒 DNA	X μl 中共含 10 μg	Y μl 中共含 4.5 μg
10 mg/ml PLO	2.16 μl	0.98 μl

(2) 吸弃培养基，用预温的 PBS 清洗培养板/孔一次。尽量吸弃 PBS，但避免培养板干燥。加入培养基/DNA/PLO 混合物至相应培养板/孔并立即摇匀。将培养板/孔放入培养箱中孵育 4～5 h。大约 1 h 摇晃培养板/孔一次，使转染混合物重新分布均匀。

(3) 将近 5 h 结束时，把不含生长因子添加物的 KGM 放置于室温，已含有添加剂的 KGM 则放置于 37℃。制备 DMSO/基础 KGM 的“休克”混合液，每个直径 60 mm 培养皿需要 2 ml，6 孔板每孔需要 1 ml。用细胞培养级的 DMSO，其终浓度为 24%，由于确定休克的时间期限是成功转染的重要因素，所以需要分组操作，而不是同时对所有细胞进行休克和清洗处理。

(4) 吸弃转染混合物，加入 DMSO/培养基混合液。4 min 后立即吸弃休克混合液，并用基础 KGM 轻轻清洗两次。按所需再加入含添加剂的 KGM 孵育 24～48 h。

(5) 根据所选择的报告基因载体系统收集细胞。

3.5 用 ONPG 法检测 β-gal

(1) 在微孔板 (Falcon 353915 或相近产品) 中混合 140 μl Z-缓冲液、20～40 μg 细胞提取物，加水至总容量为 160 μl，其中细胞提取物的容量可达到 80 μl。用细胞提取缓冲液和 Z-缓冲液制备空白对照，微孔板用盖密封或塑料膜包裹。

(2) 预加温培养板到37℃，5 min。每个孔中加入 40 μl ONPG，最低速度涡旋振荡 5 min，再密封好培养板并外用铝箔覆盖，37℃孵育，记录起始时间。

(3) 约 30 min 检查颜色变化。转染效率和蛋白质含量决定反应的时间。出现中等黄色的时间一般为 90～120 min，加入终止液时颜色可加深。

(4) 每孔中加入 50 μl 1 mol/L Na_2CO_3终止反应并记录时间。由于反应仍会缓慢持续进行，所以应该尽快读取数据。

(5) 如果微量滴定板读数仪有自动混匀功能，可操作两次，每次 20 s，或者在涡旋混匀器上以最低速度振荡约 1 min，在 420 nm 波长处读取吸光值。

(6) 计算：

特异活性 ＝［被裂解的 ONPG 量(nmol)/ 时间(min)］/ 提取物蛋白质量(mg)

被裂解的 ONPG 量(nmol) ＝ $OD_{420}/0.0045$

3.6 CRPG 法检测 β-gal［见注意事项（15)］

(1) 检测当天向磷酸盐缓冲液中新鲜加入 $MgCl_2$ 和 β-巯基乙醇（β-ME）以配制 2× CRPG 反应缓冲液：12.1 ml 2× 磷酸盐缓冲液、225 μl 1 mol/L $MgCl_2$、177 μl β-ME，终浓度分别为 160 mmol/L、18 mmol/L 和 204 mmol/L。

(2) 微量滴定板每孔中加入 100 μl 2× CRPG 反应缓冲液、细胞提取物和水至 160 μl。用缓冲液和非转染细胞提取物分别建立反应空白和背景对照孔。所有样本、空白和对照孔均作复孔。

(3) 加入 40 μl 20 mmol/L CRPG 以达到每孔 200 μl 的总量，盖好微量滴定板。涡旋混匀器上以最低速度振荡 5 min。铝箔覆盖，37℃孵育 10 min，此后检查颜色变化。孵育一般需要 30～60 min，间歇观察颜色变化。这种检测方法比 ONPG 法更迅速。

(4) 570 nm 处读数。如果微量滴定板读数仪有自动混匀功能，可操作两次，每次 20 s，或者在涡旋混匀器上以最低速度振荡 1 min，以保证读数前孔中颜色彻底均匀，计算 OD_{570}/蛋白质的量（μg）。

3.7 β-gal 原位染色

在优化转染程序的过程中，本实验方法是一种便捷的补充手段，用于测定细胞的转染效率。

(1) 吸弃转染细胞的培养基，PBS 清洗两次。用含 2%多聚甲醛-0.2%戊二醛的 PBS 于 4℃中固定 15 min。PBS 清洗两次。

(2) 每个 60 mm 平皿中加入 1.8 ml β-gal 反应液，室温下放置 5 min，然后加 0.20 ml含 X-gal 的 DMF，X-gal 终浓度为 2 mg/ml。37℃孵育，孵育时间取决于颜色变化。含 CMV 启动子的转染体系约需 30 min。4℃状态下，培养板/孔加入 50%甘油可保存数天。

4 注意事项

(1) 提及的任何特定供应商仅为了实验方便，而非受到特别资助。所有制备组织细

胞培养基所需的塑料制品和玻璃器具包括药匙和搅拌子，应与实验室常规使用的器皿分开放置，并在使用前进行高压消毒。所有溶液配制水源必须是商品化的无致热原水或经检测的自制双蒸水，如 Nanopure，或相近质量的水。

(2) 这是适用于许多连续人角质形成细胞系的最基本的培养液配方[5]。有关无血清、含血清、人或小鼠角质形成细胞所需的特殊培养基等具体情况，读者可参阅 Leigh 和 Watt 的编辑内容[3]或商品化培养基的材料。

(3) 配制溶液时所用的 pH 计应进行两点校正法校正，最好是使用返回报告探针效率为百分率斜度的 pH 计。因为 pH 计可能会出现偏差，当不同批次配制的 2× HBS 和 2× BBS 的 pH 差异在 0.05 单位时，即可影响转染效率。

(4) 种植于 3T3 滋养层上的原代角质形成细胞，传代前需在培养板表面用含 0.02%EDTA 的 PBS 反复吹吸，以清除成纤维细胞。更好的细胞再黏附和更稳定的转染结果取决于对原代和传代细胞系的细致维护。原代的角质形成细胞培养不能超过 70%～80%汇合，相差显微镜观察细胞无分层现象。在细胞刚要汇合之前，收集的角质形成细胞系（SCC13、HaCaT 或相似细胞系）呈现更稳定的转染效率[5]。经验表明稠密的、细胞已完全汇合之后的培养板尽管细胞产量高，但根据常规报告基因载体（如 CMV-β-gal）的转染效率和角质形成细胞特异性启动子的表达强度来判断，均提示转染结果不稳定。对于原代培养的角质形成细胞，转染常用 2～4 代的传代细胞；对于角质形成细胞系，可用连续传代的细胞进行重复试验；对于冻存的连续细胞系应该尽可能用传代次数最少的细胞进行转染。

(5) 计算所有培养板/孔的细胞和含血清培养基的需要量，考虑到移液误差，一般多计算两个孔的细胞和培养基用量。例如，计划在 4 个 6 孔板（共 24 孔）中接种 HaCaT 细胞，可按 26 孔计算基本的细胞和培养基需求量。记录细胞传代数。需准备足够的培养板/孔用于测定 DNA 重组质粒，至少设置两个复孔，三个复孔更好，并包括模拟转染（仅有 DNA 载体）或未转染（没有 DNA 沉淀）的培养板/孔。

(6) 重复试验时，任何时间间隔或时限，如从细胞接种到转染，或细胞转染后到洗涤的每一时间间隔都要确定并固定一致。总的转染后时间应以不同细胞类型和不同报告基因系统的特异性组合来单独地确定。我们的实验是关于核受体报告基因活化方面的研究，转染后时间通常为 62 h，其最后的 48 h 加有对照培养基或有含配体的培养基。其他表达强度较高的报告基因质粒，例如，带有长片段角质形成细胞特异性启动子的报告基因，转染时间可适当缩短。

(7) 我们为不同的试验方法提供了常用转染所需各成分的剂量。磷酸钙共沉淀法的试剂配制可按比例增减；终容量按转染培养的培养板/孔所需培养基容量的 10%计算（5%的水、质粒 DNA 和氯化钙；5%的 2× HBS）。可供参考的是，6 孔培养板每孔可加入 0.5～1.5 μg CAT 报告基因质粒、效应质粒（含有启动子调节蛋白 cDNA 的各种表达质粒）、0.1 μg CMV-β-gal 作为内转染标准，以及载体质粒 DNA（如 KS^+ Bluescript），至所标注的 DNA 总含量。尽管一些检测 CAT 表达的方法是可行的，我们发现商品化的酶联免疫吸附检测方法具有敏感性强、操作简便的特点，可根据供应商提供的说明书进行操作，且无放射性材料及其相关的处理丢弃问题。

(8) 质粒 DNA 的质量对于进行高效的转染至关重要。可从以下几个方面进行质量

控制。

a. 质粒 DNA 的制备　用商业化吸收柱纯化试剂盒（Qiagen）和氯化铯密度梯度离心法两种方法提取同样的质粒进行平行比较。由于在速度上有一定优势，且不需要清除氯化铯梯度法中的有害废物溴化乙锭，柱纯化法不逊于或优于氯化铯梯度离心法。不管用何种提取方法，在相同转染试验中使用的任何质粒，要同时用相似的稀释度测定质粒的 260 nm 和 280 nm 吸光度，当 $OD_{260/280}$ 比值偏差较大时需要再纯化。无菌条件下在 10 mmol/L Tris-HCl（pH 8）中制备的质粒用于瞬时转染无需灭菌处理。当制备质粒浓度≥1 μg/μl 时，沉淀混合物中应限量加入 Tris，必要时在转染前可用无菌水稀释。

b. 物理性状比较　对相似质粒的功能进行比较时，如同一启动子的不同启动子区域驱动的 CAT，或野生型和突变转录因子表达的比较，我们设置了额外的质量对照，以保证检测结果不是由于质粒 DNA 提取的质量偏差所致。每种质粒稀释到 25 ng/μl，分别将 50 ng、150 ng 和 250 ng 未消化质粒加入适当百分浓度的凝胶（一般为 0.6%～0.8%）加样孔中进行电泳分析，比较不同重组质粒之间的相对亮度，以及同一制备样本的不同质粒种类（如超螺旋形、松弛环形和多联体）的相对亮度。在每一质粒分离物中主要应该是超螺旋形条带，不同质粒之间超螺旋形条带的亮度类似，但大小允许有一定偏差。快速移行的淡薄领先条带可能是对细菌裂解物过度碱化处理而形成的不可逆变性 DNA，不能用于转染。

（9）在层流通风橱内进行所有混合步骤。实验开始时，先准备好涡旋混匀器、微量离心机、已做标记的离心管和溶液等以避免反复进出层流通风橱。微量离心机占地面积小，能满足试验所需离心力的要求。所有转染方法都应尽量缩短转染用培养板/孔离开孵育箱的时间，从而减少培养基的 pH 漂移。

（10）少量沉淀可手工混匀。当比较重组效应质粒的剂量、野生型与突变型质粒等的时候，我们通常要处理 8～10 种不同的转染复合物，易引起工作疲劳和混合不一致。带有标准试管杯的涡旋混匀器可轻易与 Falcon 2059 管匹配。在 50 ml 泡沫试管格中分隔成三个完整的试管孔，将试管杯推入中央孔，即可反转固定于涡旋混匀器上，Falcon 2059 管即可穿过泡沫放入边孔中。

（11）当加入转染混合物的培养细胞已置于培养箱中进行过夜孵育时，应限制开闭培养箱的次数，因为在标准和低 CO_2 磷酸钙转染方法中，培养基的 pH 对沉淀的有效形成至关重要。培养箱对空气流通的控制掌控和 CO_2 感受器设置的问题决定了整个培养箱内完全达到预期 CO_2 水平的时间可能会有明显的滞后，因而允许培养基的 pH 有一定的漂移。当进行任一操作步骤时，培养箱仪表上显示的 CO_2 水平读数都必须经过常规 Fyrite 二氧化碳检测仪（Bacharach）确认。

（12）肉眼观察如见培养基表面漂浮有片状的红色物提示 2× HBS 或培养基的 pH 出现异常，即转染结果不理想。显微镜观察，在我们实验中的沉淀物对大部分角质形成细胞系无明显影响，而对其他细胞系有可能出现细胞变圆、离壁浮起，均提示需要缩短细胞暴露于沉淀混合物的时间。PBS 清洗后，一些沉淀可能持续覆盖在细胞表面或培养板/孔的其他部位，这似乎对细胞并无害处，一般再过 24 h 即可溶解。

（13）由于没有一套实验操作指南能预测出适用于各类角质形成细胞系或生理状态细胞的最佳条件以达到所研究质粒的最好表达[5]，因此这里提供了转染后可供选择的渗

透“休克”步骤。吸弃培养板/孔中培养基/沉淀混合物，根据不同细胞系的敏感性，加入10%甘油或10%DMSO（每个60 mm培养皿加入1 ml，6孔培养板每孔加入0.5 ml)，让溶液均匀地分布，并与细胞持续接触3 min。由于要严格地控制接触的时间，所以对于同一时间操作的培养板/孔数量应有一定限制。在甘油溶液中加入预加温的PBS（每个60 mm培养皿加入2 ml，6孔培养板每孔加入1 ml)，轻旋稀释后立即吸弃。再用预加温的PBS清洗两次，加入含血清的角质形成细胞培养基。

（14）整个转染过程需要一整天，但只在流程开始和临近结束时需要动手操作，清晨添加DNA质粒，日间孵育并间歇性摇晃培养板/孔，晚上清洗细胞和添加培养基。操作时配制量可按比例增加或减少，但DNA：PLO质量比必须稳定在0.42～0.46[4]。

（15）在β-gal活性检测中，尽管CRPG底物比ONPG昂贵，但较ONPG敏感10倍左右。用反复冻融法（三次）或用Roche公司CAT检测系统的抽提缓冲液制备细胞提取物。就含SV40或CMV驱动的β-半乳糖苷酶报告基因检测而言，20～40 μg可溶性细胞提取蛋白足够进行30 min的检测。

致　谢：NIAMS和NIEHS的作者在USPHS/NIH资助的研究工作中对诸多操作流程进行了优化。

（牛轶雯 译　陆树良 校）

参考文献

[1] Ghazizadeh, S. and Taichman, L. B. (2000) Virus-mediated gene transfer for cutaneous gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **11**, 2247—2251.

[2] Dass, C. R. (2002) Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy in-vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 593 601.

[3] Leigh, I. M. and Watt, F. M. (1994) *Keratinocyte Methods*, Cambridge University Press, Cambridge.

[4] Nead, M. A. and McCance, D. J. (1995) Poly-L-ornithine-mediated transfection of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 668—671.

[5] Aneskievich, B. J. (2001) Deletion of RAR carboxyl terminus reveals promoter-and receptor-specific AF-1 effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 950--956.

[6] Chen, C. A. and Okayama, H. (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6**, 632—638

第29章　四环素调控下表皮角质形成细胞的基因表达

Richard B. Presland，Philip Fleckman

摘　要：由Gossen和Bujard建立的四环素调控表达系统是一个强有力的遗传学工具，用该系统导入培养细胞或转基因动物的任何基因构建体的表达都能够被精确地控制。它包括两个部分：一个是基于原核四环素阻遏物（TetR）的调节成分；一个是在四环素反应元件控制下可表达目的基因的应答质粒。在本章里，我们回顾了四环素调控表达系统的方法学，讨论了可以利用的有关载体系统，描述了如何制备在四环素调控下表达基因的角质形成细胞系并观察其特征。这一方法学涉及建立表达TetR蛋白（tTA或rt-TA两者之一，它们表达为带有VP16激活区的融合蛋白）的稳定细胞系，以及建立在四环素调控下表达TetR和应答质粒（四环素应答元件——基因*X*）的双重稳定细胞系。在此方法的一个举例中，我们讨论了最近建立的一个角质形成细胞系，该细胞系能在四环素调控方式下表达人中间丝相关蛋白。现在已经获得了该技术的逆转录病毒载体和腺病毒载体，它们不仅可以用于研究对细胞有毒性的基因，而且更广泛地用于了解基因如何调控细胞的结构、功能、生长和分化的相关研究。

关键词：角质形成细胞；四环素诱导系统；稳定转染；强力霉素；受调控的基因表达

1　导言

在培养的角质形成细胞中稳定表达转染的基因是研究基因功能和特定蛋白质如何影响生长、分化的一个有效方法。然而，该技术的一个主要缺点是组成性表达的基因通常对细胞有毒或有害，而且往往很难在一个特定基因产物的直接和间接效应之间做出判别[1,2]。为了克服这些局限，许多实验室设计出可诱导的调控系统，在该系统中感兴趣的基因仅在添加某个药物或化合物后才表达。其中应用得最为广泛的是由Gossen和Bujard发展起来的四环素调控系统[3~5]。除了常规的体外质粒转染，四环素调控系统已经应用于经逆转录病毒和腺病毒导入基因，以及转基因鼠和植物，证明了它在体内和体外基因表达研究中的广泛应用性[6~11]。这个系统的其他优点包括低浓度（一般为1～2 μg/ml）的四环素对真核细胞无细胞毒作用，以及能够通过改变四环素浓度的方法以剂量依赖的方式操纵转基因的表达[4,10]。

四环素调控系统包括两个关键成分：一个是与四环素及其衍生物相结合的四环素阻遏物或调控物（TetR）；另一个是受四环素调控的启动子，它含有能结合TetR和调控下游基因表达的四环素操纵子（tetO）序列（也称为四环素应答元件或TRE）（图29.1）。在用于哺乳动物细胞的大多数TetR系统中，TetR与来源于单纯疱疹病毒VP16的C端激活区以融合蛋白的形式表达。VP16激活区允许TetR调节蛋白激活真

核基因[3,4]。目前可以利用的四环素调控系统主要有两种，被称作 Tet-On™ 和 Tet-Off ™系统。两种系统的主要差别在于哺乳动物细胞所表达的四环素调控物的性质，它依次决定着在有或无四环素存在的情况下是否表达所调控的转基因。在早期描述的 Tet-Off 系统中，TetR-VP16 蛋白（指的是 tTA）在没有四环素存在的情况下可以结合 TRE，并且激活转基因的表达[3]，在四环素存在的情况下，tTA-VP16 蛋白关闭基因 *X* 的转录（图29.1）。在 Tet-On 系统中，TetR-VP16 蛋白（指的是 rtTA 或可逆 TetR）在四环素存在的情况下结合 TRE，诱导转基因的表达[4]（图 29.1）。rtTA 系统由体外突变的天然 *tTA* 基因所产生。上述两种系统目前都可以从市场上获得。

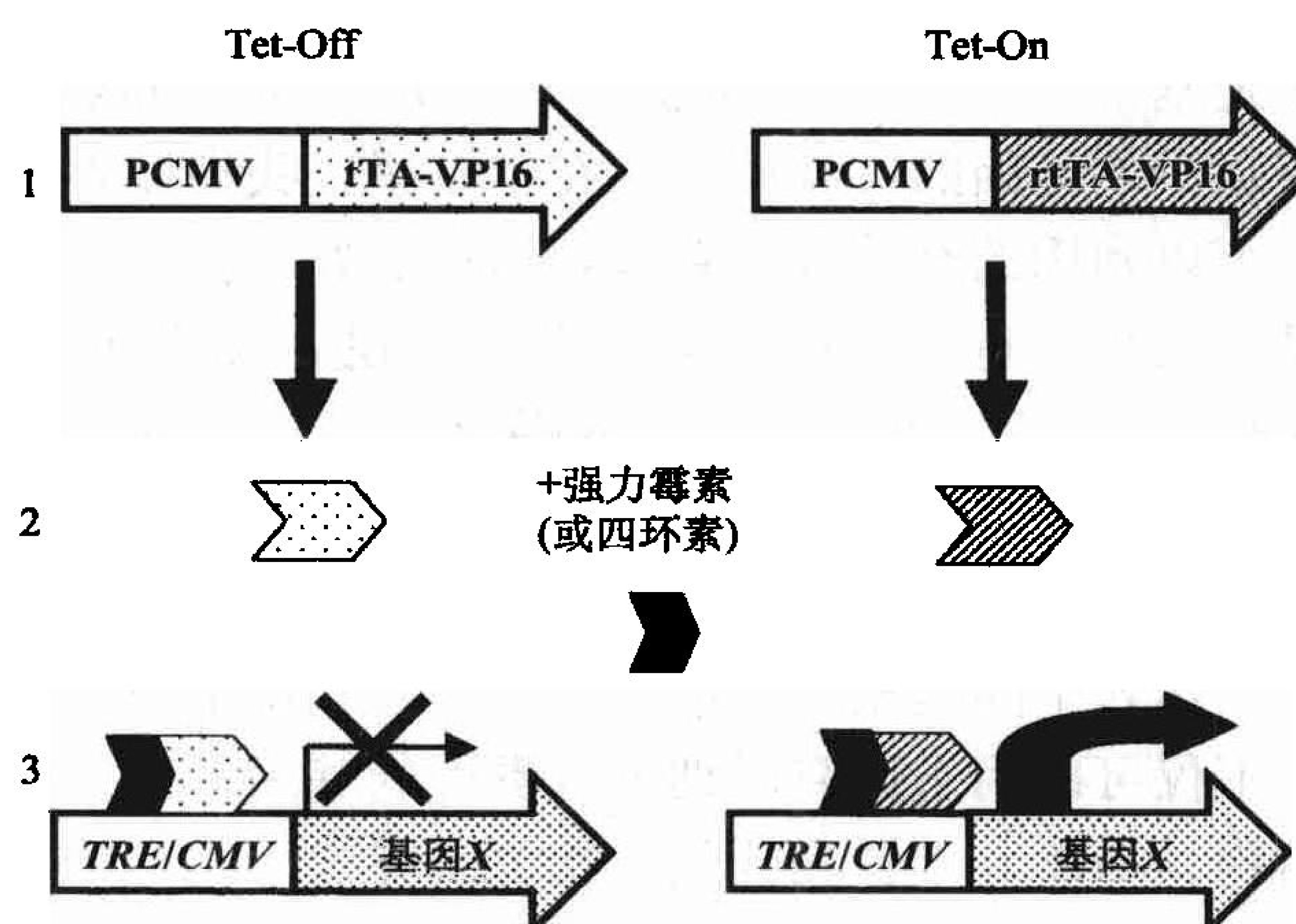


图 29.1　Tet-Off 和 Tet-On 系统的简略示意图

在第一次转染中（1），细胞能稳定地转染携带新霉素抗性基因的 TetR 调控质粒，该质粒表达 tTA-VP16（Tet-Off）或 rtTA-VP16（Tet-On）融合蛋白。然后新霉素抗性细胞系可用于检测 TetR 的表达。一旦完成导入 TRE-基因 *X* 应答质粒或靶质粒的第二次转染，四环素或强力霉素就可以调控基因 *X* 的表达（2）。给 Tet-Off细胞添加四环素或强力霉素可以关闭基因 *X* 的表达，而给 Tet-On 细胞添加这些抗生素就激活基因 *X* 的表达（3）。

本章将描述建立角质形成细胞系的实验方案，该细胞系可在四环素调控下表达导入的外源基因。这一系统已经用于研究多种角质形成细胞基因在体外[1,12]或转基因鼠表皮的表达[13~15]，表明其在研究角质形成细胞生物学有关编址问题中的有效性。为了简化这些方法的讨论，我们将主要关注 Tet-On 系统，我们已利用该系统在表皮角质形成细胞中诱导表达人中间丝相关蛋白[1]。该方案的许多步骤可用于 Tet-Off 系统，其主要区别是当四环素从培养基中除去以后，即在缺少四环素情况下四环素应答性基因的表达被打开。

当你的实验室要建立这一系统时，要涉及下列几个关键步骤：①用 TetR 调控质粒转染角质形成细胞，制备表达 TetR 的稳定（新霉素抗性）细胞系；②分析表达 TetR 的新霉素抗性细胞系，以及其在瞬时转染 TRE 报告基因（如 TRE-β-半乳糖苷酶）后的四环素可诱导性；③用 TRE 转基因构建物（应答或靶质粒）转染适当的（也即高效诱导性）细胞系，制备携带 TRE 转基因的双重稳定细胞系；④证实了在四环素存在的情况下可诱导应答基因（基因 *X*）的表达；⑤细胞系的特性。一些研究者

已经设法避开了两步转染法，在同一个实验中同时转染了 TetR 调控质粒和应答质粒（TRE 基因 *X*），这就节约了时间和经费，但结果常不令人满意，一般不推荐使用［见注意事项（1）］。

虽然包括我们在内的许多实验室在 20 世纪 90 年代已从海德堡大学的 H. Bujard 教授处获得了质粒，但是该技术现在可以从下列两个来源获取。Tet 系统®（Tet-On™和 Tet-Off™系统）的技术已经授权给 Clontech 公司［见注意事项（2）］，T-REx™系统可从 Invitrogen 公司处获得，该系统是缺乏 VP16 激活区 Tet 系统的改良形式[16,17]。因此，我们将提到所用质粒的商业名称和来源，以及为在角质形成细胞中建立四环素调控系统所用的其他试剂。

2 材料

2.1 质粒

2.1.1 TetR 表达质粒

（1）pTet-On™质粒（cat. no. 631018）或 pTet-Off™质粒（cat. no. 631017）（Clontech，Palo Alto，CA）。

（2）pcDNA™6/TR 质粒（Invitrogen，Carlsbad，CA），可通过购买 T-REx™完整试剂盒（Complete Kit；cat. no. K1020-01）或核心试剂盒（Core Kit；cat. no. K1020-02）获得。

2.1.2 TRE 质粒

现在有很多包含报道基因或多位点接头的 tetO（TRE）质粒可用于基因克隆，下面是几个例子。

2.1.2.1 报道质粒

（1）pTRE-Tight-EGFP，包含绿色荧光蛋白（GFP）基因的阳性对照质粒（Clontech；cat. no. 631060）。

（2）pTRE2-Tight-DsRed2，包含红色荧光蛋白基因的阳性对照质粒（Clontech；cat. no. 631061）。

（3）pcDNA™4/TO/*lacZ* 和 pcDNA™4/TO/*myc*-His/*lacZ*，包含 β-半乳糖苷酶基因的阳性对照质粒。可通过购买 T-REx™完整试剂盒（Complete Kit；cat. no. K1020-01）或核心试剂盒（Core Kit；cat. no. K1020-02）获得。

2.1.2.2 用于基因克隆的 TRE 质粒

已设计出的质粒包含位于 TRE 上游的巨细胞病毒（CMV）启动子，可带有或者没有增强子，以及用于表达标记蛋白的一个或更多表位标签的克隆位点，例如，带有 *c-myc*、HA 或六组氨酸（6xHN）标签。在这些质粒中，有些包含一种药物选择标记，而另一些则没有。部分可以利用的质粒如下。

（1）pTRE2hyg2-Myc、—HA 和—6xHN：带有多克隆位点、所标示的 N 端表位

标签及编码潮霉素（hygromycin）耐药基因的 tetO 质粒（分别是 Clontech；cat. nos. 631052、631051 和 631053）。

（2）pTRE2pur-Myc、—HA 和—6xHN：含有多克隆位点、所标示的 N 端表位标签及编码吡咯霉素耐药基因的 tetO 质粒（分别是 Clontech；cat. nos. 631055、631054 和 631056）。

（3）pTRE-Myc、pTRE-HA 和 pTRE-6xHN：带有多克隆位点和所标示的 N 端表位标签的 tetO 质粒。这些质粒缺少抗生素选择标记（分别是 Clontech；cat. no. 631010、631012 和 631009）。

（4）pcDNA™4/TO：含有多克隆位点、编码 Zeocin™耐药基因的可用于基因克隆的 tetO 质粒。可通过购买 T-REx™完整试剂盒（Complete Kit；cat. no. K1020-01）或核心试剂盒（Core Kit；cat. no. K1020-02）获得。

（5）pcDNA™4/TO/*myc*-His A、B、和 C：在所有三个读框中带有多克隆位点、*c-myc* 和六组氨酸标签，以及编码 Zeocin™ 耐药基因的 tetO 质粒。可通过购买 T-REx™完整试剂盒（Complete Kit；cat. no. K1020-01）或核心试剂盒（Core Kit；cat. no. K1020-02）获得。

2.1.3 其他质粒

pTK-Hyg 和 pPUR 质粒分别带有潮霉素和嘌呤霉素的耐药基因（Clontech；cat. no. 631750 和 631601）。如果在第二次转染（见 3.3）所用的 TRE 质粒没有这样的选择性标记，就需要这些具有药物可选择性标记质粒或其等同物中的一个。

2.2 角质形成细胞系

像任何细胞系一样，所有角质形成细胞系的选择都是折中进行的。人们通常用相对稳定和永生的细胞系（该细胞系通常容易培养和传代）与从组织直接培养所获的更“正常”的细胞系（它们偏离有限的生命周期，培养条件要求苛刻）做交换。细胞系的选择取决于细胞系的便利（易于获得，培养方便）和特性（如某一细胞系的确表达某一角质形成细胞分化的标记）。至于稳定转染，更“正常”的细胞系常不实用。所选择的任何细胞系应供应充足并且适于冰冻保存，以确保原材料的可靠来源。应该对解冻细胞系的特性有更好的了解，然后作为实验的原材料。

某些角质形成细胞系可以从美国模式菌种收藏所（ATCC，Manassas，VA）购买，而其他则可从各个实验室获得。下面的清单是一些可利用的角质形成细胞系。

（1）到 2003 年 10 月为止，可以从 ATCC 获得下列人表皮或表皮样细胞系：

A-431，cat. no. CRL-1555

SCC-4，cat. no. CRL-1624

SCC-9，cat. no. CRL-1629

SCC-15，cat. no. CRL-1623

SCC-25，cat. no. CRL-1628

（2）HaCaT 人角质形成细胞系[18]可从 Norbert Fusenig 博士 [German Cancer Research Center（DKFZ），Im Neuenheimer Feld 280，69120 Heidelberg，Germany，E-

mail：N. Fusenig@DKFZ-Heidelberg. de. ］处获得。

（3）我们常用的大鼠表皮角质形成细胞系（REK）[1,19,20]可从 Dr. H. P. Baden 博士[21]（Massachusetts General Hospital，Cutaneous Biology Research Center，13th Street Building 149，Charlestown，MA 02129，e-mail：howard. baden @ cbrc2. mgh. harvard. edu）处获得。

（4）非转化（自发）的人角质形成细胞系 NM-1 可从 H. Baden 博士[22,23]处获得。

（5）人角质形成细胞系 RHEK 可用病毒癌基因转染原代人角质形成细胞系获得[24]。

2.3 其他的关键试剂

（1）转染试剂，如不同大小包装的 Lipofectamine™（Invitrogen；cat. no. 18324-111）。许多其他的以脂质体和非脂质体为基础的转染试剂可从众多的供应商处购买。这里我们描述用 Lipofectamine 进行转染的实验方案（见 3. 1. 2）。

（2）强力霉素（Sigma Chemical Co. ，St. Louis，MO；cat. no. D9891 或 Clontech；cat. no. 631311）是大多数实验室所使用的四环素衍生物［见注意事项（3）］。用无菌水制备 1 mg/ml 储存液，过滤除菌，分装后避光保存于－20℃，可稳定至少 6 个月。当操作这些化学试剂时应戴手套。在细胞培养的诱导实验中所用的终浓度通常为 0. 2～1 μg/ml 培养基[4]。

2.4 细胞培养

（1）遗传霉素®选择性抗生素（G418 硫酸盐）可以从 Invitrogen（cat. no. 11811031）和 Clontech（cat. no. 631307）等几个供货商处获得。它以粉剂形式储存于室温，可稳定达 3 年之久。储存液（50 mg/ml）可用 I 型无内毒素水配制，再用 NaOH 调整 pH 到 7. 0，过滤灭菌，应保存在 2～8℃。操作时戴上手套和口罩。

（2）潮霉素 B 可以从 Calbiochem（San Diego，CA；cat. no. 400050）和 Clontech（cat. no. 631309）等几个供货商获得。储存液（50 mg/ml）用无内毒素水配制，过滤灭菌，可在－20℃或 4℃下保存数年。操作时戴上手套和口罩。

（3）HEPES 缓冲盐水（HBS），pH 7. 4，每升含 30 mmol/L HEPES、4 mmol/L 葡萄糖（右旋糖）、3 mmol/L KCl、130 mmol/L NaCl、1 mmol/L Na_2HPO_4，以及 0. 0012 g 酚红。用无内毒素水配制 HBS，1 mol/L NaOH 调整 pH 至 7. 4，过滤灭菌[25]（参见 Pirrone 等，本书第 1 章）。

（4）0. 05% 胰蛋白酶，0. 53 mmol/L 乙二胺四乙酸（Invitrogen；cat. no. 25300-062），分装成 50 ml，－4℃保存，多次冻融可保持稳定。

（5）低葡萄糖型 DMEM（Invitrogen；cat. no. 31600-034）。加入 3. 7 g/L 碳酸氢钠，调整 pH 到 6. 7，过滤灭菌。4℃避光保存。

（6）胎牛血清（FBS）可以从多个供货商处购买［见注意事项（4）］。我们目前使用的 FBS 未经加热灭活（Atlanta Biologicals，Norcross，GA；cat. no. S11150）。血清应经细胞活性检验，以及细胞铺满后诱导丝聚合蛋白原和 K1 表达的检验[20,21]。FBS 应该避光保存在－80 ℃。

（7）青霉素-链霉素（10 000 U/ml 青霉素，10 000 μg/ml 链霉素，Invitrogen；cat. no. 15140-022）。

（8）氨基胍硝酸盐（Sigma-Aldrich Chemical Co.；cat. no. A5610-8）。用无内毒素水配制成 0.75 mol/L 储存液，过滤灭菌；储存液保存在 4℃，每 6～8 周新鲜配制一次。培养 REK 细胞系时，加热储存液到 37℃，振荡混匀 10 s，每毫升角质形成细胞培养基加 1 μl 储存液（终浓度为 0.75 mmol/L）。

（9）REK 细胞系的 20%培养液系含有 20%FBS、1%青霉素-链霉素、0.4 μg/ml 氢化可的松，以及 0.75 mmol/L 氨基胍硝酸盐的 DMEM。不加氨基胍可避光在 4℃稳定两周，氨基胍在每次接种细胞时新鲜加入［见步骤（8）］。20%的培养基用来运送细胞，而细胞接种在 10%的培养基中用于转染。

（10）从 Bellco Glass 公司购买玻璃克隆环（Bellco Glass Inc.，Vineland，NJ，cat. no. 2090-00808），放在底部盛有硅酮真空油脂的玻璃培养皿中高压灭菌。

（11）用来转染的聚乙烯培养离心管（Corning，Harrodsburg，KY；cat. no. 430055）。

（12）用于确认 tetR 表达的 VP16 多克隆抗体（Clontech；cat. no. 631209）。

（13）用于抽提 RNA 的 TRI Reagent（Molecular Research Center，Inc.，Cincinnati，OH；cat. no. TR 118）或 RNAqueous™ 试剂盒（Ambion，Austin，TX；cat. no. 1914 或 1912）。

（14）β-半乳糖苷酶测定试剂盒可从 Stratagene 公司（San Diego，CA；cat. no. 200383或 200710）或 Promega 公司（Madison，WI；cat. no. E2000）购买。

3 方法

每一种角质形成细胞系都有特殊的生长要求。这里详细介绍的方法是关于角质形成细胞的培养，尤其是细胞的生长条件和转染方法，并已针对 REK 细胞系进行了优化。这些实验方案在用于特定的细胞系时需要进行改进。

3.1 步骤 1：表达 TetR 的角质形成细胞的产生

这一部分描述表达 TetR 角质形成细胞的产生方法。它包括三个部分：TetR 质粒的转染；细胞毒性药物 G418 杀死未转染细胞的筛选；新霉素耐药性角质形成细胞系的分离。

3.1.1 REK 细胞系的培养

（1）每个培养角质形成细胞的培养皿用温 HBS 冲洗两次，每次用 5 ml。

（2）用 5 ml 温胰蛋白酶溶液消化细胞。

（3）在血细胞计数器中计数细胞。每个 60 mm 培养皿接种 4×10^4 个角质形成细胞，加 5 ml 20%培养基用于传代培养。如果每 5 ml 培养基中加入少于 100 μl 的细胞-胰蛋白酶溶液，则细胞不需要离心。

（4）在 10%的培养基中以下列密度接种细胞用于转染，转染时培养基中不加氨基胍：

a. 60 mm 培养皿加入含细胞数为 3×10^4 的 5 ml 10%培养基。

b. 12 孔培养板的每孔加入含细胞数为 1×10^4 的 1.5 ml 10%培养基。

c. 转染前 5 d 开始接种细胞培养，转染前 1 d 必须换液，细胞的铺满程度应不超过 60%～70%。

(5) 每周传代一次，每周换液两次，也就是每两次传代之间换液一次。

3.1.2 角质形成细胞（REK）的转染和筛选

可用于转染角质形成细胞的方法很多[20,26]。在这里描述了我们应用Lipofectamine ™[2] 试剂转染大鼠表皮角质形成细胞的方法。

(1) 用温 HBS 冲洗培养有角质形成细胞的 60 mm 培养皿两次，然后每个培养皿加入 2 ml 温热的单纯 DMEM（不含抗生素或血清），放回 37℃培养箱。

(2) 配制 DNA/Lipofectamine 混合物。对一个 60 mm 的培养皿来说，将下列试剂加入无菌的聚对苯二甲酸乙二醇酯培养离心管（1.1 ml 的终体积）：1072.5 μl 的单纯 DMEM，5.5 μl 质粒 DNA [1 mg/ml 的水溶液，见注意事项（5）]，22 μl Lipofectamine（终浓度：20 μl/ml DNA/DMEM 混合物）。

(3) 轻拍培养管混匀，室温下放置 10 min。再次混匀，室温再放置 10 min。不要使用涡旋振荡混匀。

(4) 在盛有单纯 DMEM 的 60 mm 培养皿中加入 1 ml DNA/脂质混合物（每个平皿的总体积为 3 ml）。将细胞与 DNA/脂质混合物孵育 4 h，不时轻轻混合。

(5) 4 h 后，每个平皿加入等体积（3 ml）的新鲜配制的 20% FBS/DMEM（不含抗生素、氢化可的松或氨基胍）。轻轻晃动，放入培养箱。

(6) 次日早上，吸去培养基，加入相应的常规培养基（以 REK 细胞系为例，采用含 10%血清、氢化可的松和抗生素的 DMEM）。

(7) 48～72 h 之后，更换培养基，加入含有 G418 的新鲜培养基 [怎样确定你所用角质形成细胞系的药物浓度，可见注意事项（6）]。就 REK 细胞系而言，我们使用 200 μg G418/ml 培养基，该浓度为实验测定能有效杀死未转染细胞所需的最低浓度。每周换两次培养基。大约 5 d 后，未转染细胞开始死亡。

(8) 继续培养角质形成细胞直到出现单独的集落，这将需要 2～4 周。这些集落来自于一个或几个已转染的祖细胞，并能在药物选择下成活。

3.1.3 稳定细胞系的分离

(1) 一旦集落已生长充分，就可以开始分离细胞系。用彩色记号笔在每个培养皿的底部标出集落的位置。这些集落应该代表来自一个或几个转染祖细胞的细胞。

(2) 用温 HBS 洗细胞两次，吸去培养皿中所有的液体。

(3) 用镊子在培养皿表面稳固地放一个无菌的玻璃克隆环以围住有角质形成细胞集落的区域。注意不要让克隆环在培养皿底部滑动，这样的滑动可以损害有活力的细胞。这一步要尽快完成以防细胞脱水。

(4) 用胰蛋白酶消化在克隆环中的细胞（REK 细胞系需用胰蛋白酶在 37℃下消化 5～8 min）。用无菌巴斯德吸管吸取 10%FBS/DMEM 轻轻洗细胞。将细胞转移到大小

合适的培养皿进行增殖和扩展。细胞在 6 孔、12 孔、24 孔板都生长良好，这依赖于细胞类型、生长率和集落大小。一旦这些细胞系经过一次或两次传代，它们就可以用来检测转染带有报道基因的 TetR 表达和可诱导性（见 3.2）。

3.2 步骤 2：检测稳定角质形成细胞系的 TetR 表达和可诱导性

3.2.1 测定稳定细胞系的 TetR 表达

可用 Northern 印迹、RT-PCR 或核糖核酸酶保护测定法检查稳定细胞系的 TetR mRNA 表达，或者采用 VP16 多克隆抗体进行蛋白质印迹分析来证实 TetR 蛋白的表达。我们以完整的 TetR cDNA 插入片段为探针，用 Northern 分析来鉴定 TetR mRNA 表达。我们获得了三个稳定细胞系，其中两个表达 TetR mRNA（图 29.2A）。

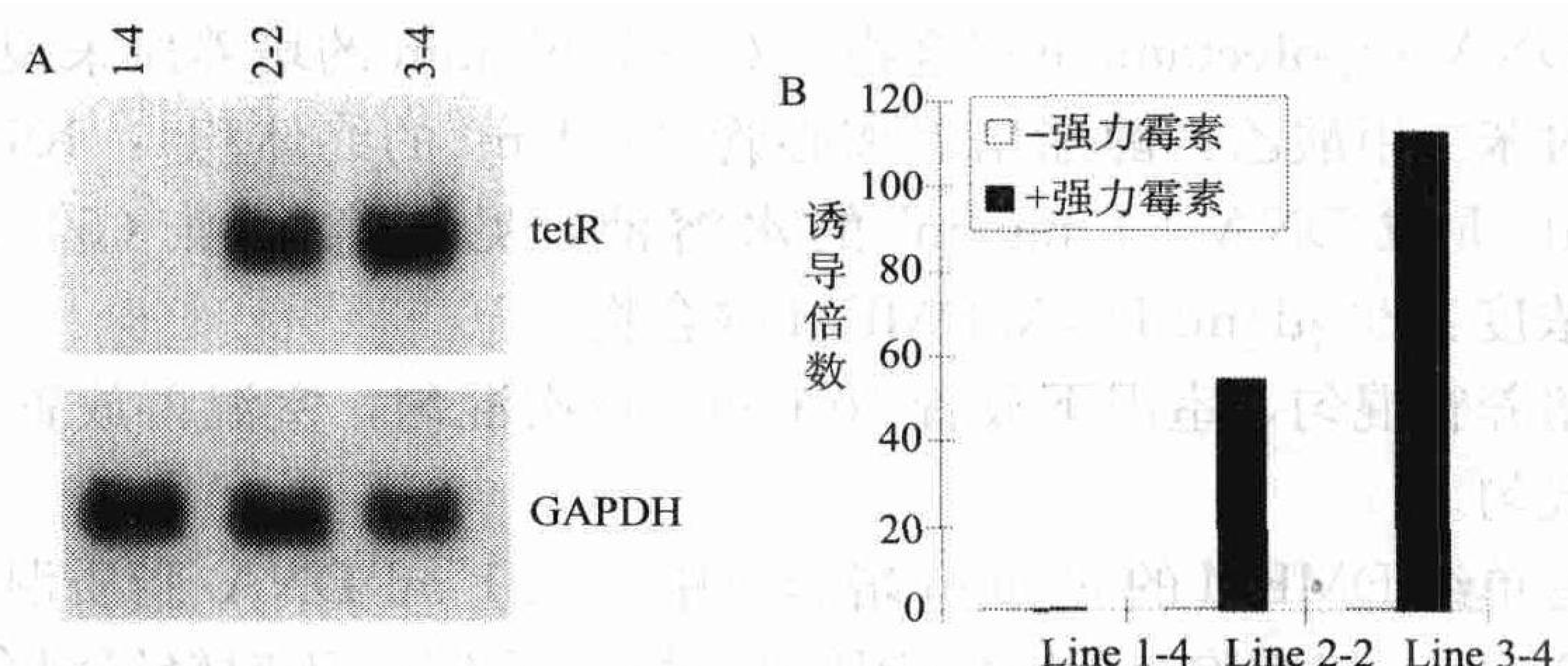


图 29.2 在三种稳定角质形成细胞系中 TetR 的四环素调节和表达

A. 角质形成细胞系表达 TetR mRNA 的 RNA 印迹（Northern blot）检测。从三种新霉素抗性角质形成细胞系中提取总 RNA，行二乙醛琼脂糖凝胶分离，转印至杂交筛选用特制尼龙膜（Genescreen Plus）上。采用 TetR cDNA 探针评价 TetR mRNA 水平。注意：细胞系 2-2（Line 2-2）和细胞系 3-4（Line 3-4）显示出良好的诱导应答和高水平的 rtTA 表达，而细胞系 1-4 则不表达 TetR。以持家基因磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）对照探针来评价 RNA 上样的均一性。B. 稳定转染 TetR（rtTA-VP16）基因并经 G418 筛选出的稳定角质形成细胞系在瞬时转染 TRE-β-半乳糖苷酶后用于检测强力霉素的诱导能力。细胞系 2-2（Line 2-2）和细胞系 3-4（Line 3-4）在 1 μg/ml 强力霉素（doxycycline）培养 48 h 后与未处理（对照）的细胞相比显示出良好的 β-半乳糖苷酶活性诱导作用。细胞系 1-4（line 1-4）因为在细胞系中缺失 TetR 表达而显示出无 β-半乳糖苷酶活性诱导表达[1]。

（1）接种 TetR 角质形成细胞系，让细胞一直生长到铺满 80%～90%。

（2）从细胞系中分离总 RNA。我们通常使用 Trizol® 试剂或 RNAqueous® 试剂盒。它们可以从培养细胞中提取高质量的 RNA，且重复性好。总 RNA 的提取应该依照厂商的建议来操作。

（3）采用已建立的分子生物学操作步骤进行 Northern 印迹、RT-PCR 或核糖核酸酶保护测定法来鉴定 TetR 表达细胞系［见注意事项（7）］。

3.2.2 瞬时转染报道质粒的 TetR 细胞系的可诱导性测定

TetR 表达细胞系应通过一种报道质粒的瞬时转染来检测四环素的可诱导性，通常采用的报道质粒是 TRE-β-半乳糖苷酶或 TRE-EGFP（见 2.1.2.1）。步骤如下。

（1）按 3.1.2 中所描述的方法用 TRE 报道质粒（1～2 μg/培养皿）转染待检测的每一种 G418 细胞系。应把每一种细胞系分成 4 份进行转染，当细胞铺满到 60%～70%

时，才进行转染。

（2）细胞转染后，在每种待检细胞系的两个培养皿中加入 1 μg/ml 强力霉素［见 3.1.2 的步骤（6）］。另外两个培养皿加入不含强力霉素的培养基作为无强力霉素的对照［见注意事项（4）］。

（3）孵育细胞 48～60 h，检测其可诱导性。用无菌的橡胶刮棒刮取和收获培养皿中的细胞。制备细胞溶解物，按厂商的说明书进行 β-半乳糖苷酶测定。用下式计算报道基因表达的诱导倍数：

$$\frac{\text{存在强力霉素时的总活性/mg 蛋白质（+强力霉素）}}{\text{无强力霉素时的总活性/mg 蛋白质（−强力霉素）}}$$

（4）扩增具有可诱导性良好的角质形成细胞系（TetR 阳性），在可能的情况下应（详见 Pirrone 等在本书第 1 章中讲述的有关角质形成细胞系的冻存）尽快制备每种细胞系的冷冻储备物［见注意事项（4）］。在我们的研究中，表达 TetR 的两种细胞系都在转染报道质粒 48 h 后表现出良好的 β-半乳糖苷酶诱导表达（图 29.2B）[1]。

3.3 步骤 3：双重稳定 Tet 细胞系的制备

在第二次的转染实验中，对显示出良好诱导反应的一个或多个 TetR 表达细胞系（见 3.2.2；图 29.2B）再用 TRE-基因 *X* 质粒或应答质粒转染，所建立的细胞系可表达感兴趣的基因。

（1）将待检测基因（表示为基因 *X*）的 cDNA 克隆到合适的 TRE 载体上。有几种形式的 TRE 应答质粒可供使用，例如，有或无巨细胞病毒增强子，或者有或无表位标签如 c-myc（见 2.1.2.2）。研究者应该查阅 Clontech 或 Invitrogen 的目录或者登录其网站以选择最能满足实验要求的质粒。

（2）接种待转染的 TetR 表达细胞系（3×10^4 个细胞/60 mm 培养皿），每种 TetR 表达细胞系至少做三个培养皿［见注意事项（8）］。

（3）将 TRE-基因 *X* 质粒 DNA 按 3.1.2 中所描述的方法转染每个细胞系。如果 TRE 质粒不含有像潮霉素或 Zeocin 的选择性标记，则需要转染第二个质粒，如 pTK-hyg（0.5～1 μg/培养皿），以便进行双重稳定细胞系的筛选。

（4）按 3.1.2 和 3.1.3 中描述的方法进行转染角质形成细胞的筛选。使用最低浓度的细胞毒性药物，如潮霉素，杀灭不含转染基因从而无抗生素耐药性的角质形成细胞。杀伤曲线实验应该以研究者打算用于制备双重稳定细胞系的每一种 Tet 表达细胞系来完成［见注意事项（6）］。

（5）用克隆环分离出成活的集落（见 3.1.3）。接种和扩增每一种细胞系，传代并用下述方法测定基因 *X* 的诱导表达。

3.4 步骤 4：双重稳定角质形成细胞系表达四环素可诱导基因的分析

（1）将要测试的细胞系以 2×10^4 个细胞的密度分别接种到两个 60 mm 的培养皿。

（2）每一细胞系的一个培养皿中加入 1 μg/ml 强力霉素［见 3.1.2 中的步骤（6）］，而另一个培养皿加入不含强力霉素的培养基（无强力霉素对照）。

（3）培养 48 h，收获细胞，制备细胞溶解物。采用合适的特异性抗体用蛋白质印迹法测定基因 *X* 编码蛋白的表达，或者采用 Northern 印迹或核糖核酸酶保护测定 mRNA 的表达。

（4）将显示出良好可诱导性基因 *X* 表达的细胞系冷冻以长期保存。

3.5 步骤 5：双重稳定角质形成细胞系的鉴定

为了优化四环素诱导的应答基因（基因 *X*）表达，应在不同的强力霉素浓度（如 0～2 μg/ml）下接种和培养双重稳定的细胞系，不同时间（12～72 h）后检测其诱导的表达。在我们的 REK 细胞系研究中，中间丝相关蛋白的表达在 1 μg/ml 强力霉素和培养 48～60 h 时达到了最大（图 29.3）[1]。在没有诱导物存在的情况下，很少或无中间丝相关蛋白表达，显示了在我们的双重稳定细胞系中 TRE 启动子功能的严密调控（图 29.2B 和 图 29.3）。虽然采用 Tet 系统的大多数研究者使用强力霉素，但其他的四环素衍生物也是有效的[4,27]。现在你就可以用你的双重稳定 Tet 细胞系开始进行基因的功能研究。

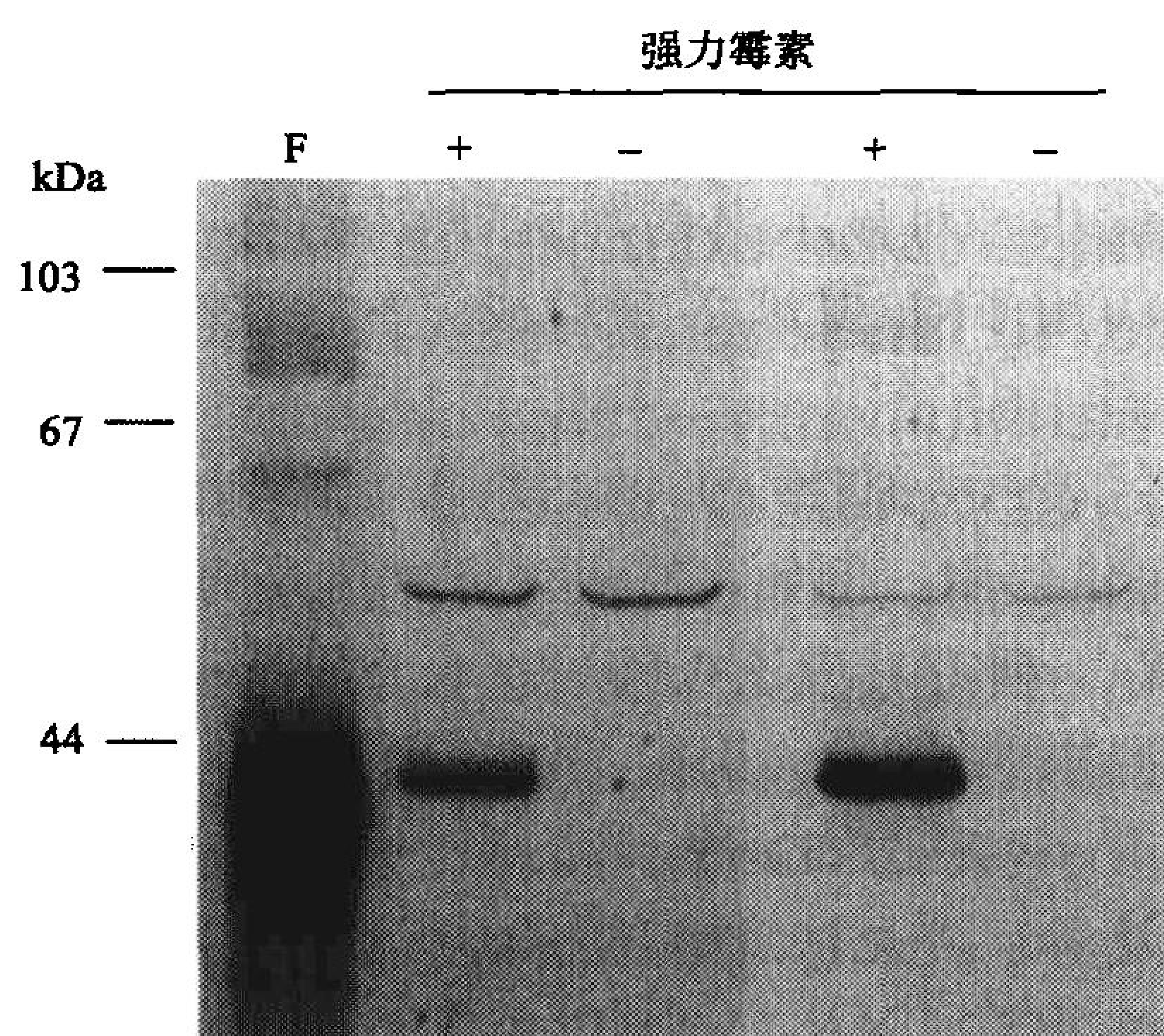


图 29.3 人中间丝相关蛋白在两种双重稳定角质形成细胞系的表达

采用人中间丝相关蛋白的抗体 8959 对 2F5 和 3F5 两种双重稳定角质形成细胞系进行蛋白质印迹法分析人中间丝相关蛋白的表达。在培养基添加的 1 μg/ml 强力霉素诱导物下，两种细胞系培养 48 h 后都表达高水平的人中间丝相关蛋白（大约 40 kDa 蛋白质，标注星号处）。hFG. 人中间丝相关蛋白；F. 人包皮作为蛋白质印迹法分析的阳性对照（参考文献［1］中有更深入的讨论）。左侧显示分子质量标准物（千道尔顿）。

4 注意事项

（1）本章概括了 Gossen 和 Bujard 介绍的四环素可诱导性细胞系的制备方法，首先制备表达 TetR 调控物的细胞系，然后导入含有 TRE-基因 *X* 的应答质粒以产生双重稳定的细胞系。这允许所用的高反应性 TetR 表达细胞系可以导入许多不同的基因。如果一起导入调控和应答质粒，那么这些质粒有倾向整合在同一染色体位点，导致最弱 TRE 启动子的基础活性增强（H. Bujard 的个人通讯）。此外，应答基因的可诱导性在不同的细胞系可以变化很大，这依赖于用于转染的调控质粒与应答质粒的比例。

（2）本章中所列举公司的免费电话号码（美国/加拿大）和因特网地址如下：

a. Ambion, Inc., Austin, TX, 800-888-8804, http://www.ambion.com

b. Atlanta Biologicals, Norcross, GA, 800-780-7788, http://www.atlantabio.com/default.htm

c. American Type Culture Collection, Manassas, VA, (800) 638-6597, http://www.atcc.org

d. Bellco Glass, Inc., Vineland, NJ, (800) 257-7043, http://www.bellco-glass.com/us

e. Calbiochem, San Diego, CA, (800) 854-3417, http://www.calbiochem.com

f. Clontech (a division of BD Biosciences), Palo Alto, CA, 1-800-662-2566, ext. 1, http://www.clontech.com

g. Corning, Harrodsburg, KY, 1-607-974-9000, http://www.corning.com

h. Invitrogen, Carlsbad, CA, (800) 955-6288, Option 1, http://www.invitrogen.com

i. Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, 800-462-9868, http://www.mrc-gene.com

j. Promega Corp., Madison, WI, 800-356-9526, http://www.promega.com

k. Qiagen, Valencia, CA, 800-426-8157, http://www.qiagen.com

l. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, 800-325-3010, http://www.sigmaaldrich.com

m. Stratagene, San Diego, CA, (800) 894-1304, http://www.stratagene.com

(3) 由于强力霉素激活 TetR 的浓度明显低于四环素（分别是 0.01～1 μg/ml 和 1～2 μg/ml），而且强力霉素在体外的半衰期明显长于四环素（分别是 24 h 和 12 h），使其成为大多数实验所选的诱导剂。其他的四环素衍生物，如无水四环素，也可以成功地用于这个系统[4,47]。

(4) 重要的是使用不含或四环素含量很少的血清批次，或者使用含有其他可以影响转基因表达和可诱导性的药物的血清批次。用于培养角质形成细胞系的血清批次应测试其对报道基因如 TRE-β-半乳糖苷酶或 TRE-EGFP 的可诱导性。通常应使用对报道基因活性具有更强诱导作用的血清批次（见 Clontech publication PT3001-1 对此问题的进一步讨论）。更为简单的替代方法是使用经四环素污染检验并被认可用于 Tet 系统的血清，例如，Clontech 公司的 Tet 系统所认可 FBS（Clontech，cat. no. 631101 或 631106）。然而，所用血清也必须支持所研究细胞系的生长和分化。

(5) 转染入 60 mm 培养皿中角质形成细胞的质粒 DNA 量可以因实验的不同而在 0.5～10 μg 之间改变。对于 TetR 表达细胞系的产生而言，我们推荐由不同的 DNA 浓度开始，如 1 μg 、5 μg 和 10 μg DNA。一些研究者在转染前用限制性内切核酸酶将质粒 DNA 线性化。这虽不会提高转染效率，但它有助于防止基因功能的破坏，如在 TetR 质粒整合入宿主细胞的染色体时。线性化质粒 DNA 的方法如下。

a. 使用在 TetR 或新霉素基因外进行剪切的限制性内切核酸酶消化 DNA，例如，*Fsp*I 消化 pcDNA4/TO，*Sca*I 消化 pTet-On™ 或 pTet-Off™。按照厂商的建议进行操作。

b. 检查质粒的线性化，即用微量 DNA（0.2 μg）进行琼脂糖凝胶电泳时存在单一条带。

c. 如果酶切满意，用乙醇沉淀法或核酸提取柱（Qiagen Nucleotide Removal Column，Qiagen，cat. no. 28306）回收线性化的质粒 DNA，将纯化的 DNA 保存于－20℃直至使用。

d. 微量的样本在琼脂糖凝胶上与紧靠的已知 DNA 分子质量的标准品一起进行电泳来估计 DNA 的浓度。

（6）抗生素杀伤曲线。杀死未转染细胞所需的抗生素浓度因特定的细胞系而变化，应该经实验进行测定。这些药物的不同批号之间也会存在效能的改变。以下的方法可以用来确定每种药物杀死宿主细胞系所需要的最小浓度。

a. 10 个 60 mm 培养皿，每个接种 2×10^4 个细胞，每个加入 5 ml 的培养基和不同浓度的 G418 或潮霉素（0～800 μg/ml）。

b. 培养细胞 10～14 d，每 3～4 d 补充一次选择性培养基，观察成活细胞的百分率。这可以通过在相差显微镜下观察黏附细胞的数量来完成，或者更精确的方法是在大约 14 d 后用胰蛋白酶消化和计数黏附细胞。为了筛选出稳定的转化细胞，使用会在 5～7 d 开始出现大量细胞死亡并在两周内杀死所有未转染细胞的最低浓度。我们发现 200 μg/ml G418 和 15 μg/ml 潮霉素是 REF 细胞系的最佳浓度。

（7）TetR cDNA 可以直接作为 Northern 印迹技术的探针。pTet-On 和 pTet-Off 载体在 Genbank 中的编号是 U89930 和 U89929，应答质粒 pTRE 的编号是 U89931。所有这些质粒都可以从 Clontech 公司获得。GenBank 的网址是 www. ncbi. nlm. nih. gov/entrez。

（8）使用冰冻保存的稳定 TetR 细胞系允许用同样的原材料来制备双重稳定的四环素反应细胞系。

致　谢：我们感谢 Ms. Anna Pirrone 对原稿提出的有益评论。这篇综述所讨论的工作来自作者所在的实验室，由 NIH 基金 R29 AR45276（Richard B. Presland）、R01 AR49183（Richard B. Presland ）资助，以及华盛顿大学皮肤病学分部的 Odland Endowed Research Fund P01 AR21557（Philip Fleckman ）资助。

（蒋丽莉　王丽华 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Presland, R. B. , Kuechle, M. K. , Lewis, S. P. , Fleckman, P. , and Dale, B. A. (2001) Regula-ted expression of human filaggrin in keratinocytes results in cytoskeletal disruption, loss of cell-cell adhesion, and cell cycle arrest. *Exp. Cell Res.* **270**, 199－213.

[2] Dale, B. A. , Presland, R. B. , Lewis, S. P. , Underwood, R. A. , and Fleckman, P. (1997) Tran-sient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of inter mediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 179－187.

[3] Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547—5551.

[4] Gossen, M. , Freundlieb, S. , Bender, G. , Muller, G. , Hillen, W. , and Bujard, H. (1995) Transcrip-

tional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766 1769.

[5] Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S. I. (1994) Acceleration of the G_1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1669—1679.

[6] Hofmann, A., Nolan, G. P., and Blau, H. M. (1996) Rapid retroviral delivery of tetracyclineinducible genes in a single autoregulatory cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5185—5190.

[7] Lindemann, D., Patriquin, E., Feng, S., and Mulligan, R. C. (1997) Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol. Med.* **3**, 466—476.

[8] Neering, S. J., Hardy, S. F., Minamoto, D., Spratt, S. K., and Jordan, C. T. (1996) Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors. *Blood* **88**, 1147—1155.

[9] Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N., and Schatz, D. G. (1995) A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6522—6526.

[10] Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., and Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expres-sion in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10, 933—10, 938.

[11] Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H., and Gatz, C. (1994). A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant J.* **5**, 559—569.

[12] Li, J. J., Cao, Y., Young, M. R., and Colburn, N. H. (2000) Induced expression of dominant negative c-jun downregulates NFkappaB and AP-1 target genes and suppresses tumor phenotype in human keratinocytes. *Mol. Carcinog.* **29**, 159—169.

[13] Diamond, I., Owolabi, T., Marco, M., Lam, C., and Glick, A. (2000) Conditional gene expression in the epidermis of transgenic mice using the tetracycline-regulated transact-ivators tTA and rTA linked to the keratin 5 promoter. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 788—794.

[14] Liu, X., Alexander, V., Vijayachandra, K., Bhogte, E., Diamond, I., and Glick, A. (2001) Conditional epidermal expression of TGFbeta 1 blocks neonatal lethality but causes a rever-sible hyperplasia and alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9139—9144.

[15] Jaubert, J., Cheng, J., and Segre, J. A. (2003) Ectopic expression of Kruppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier. *Development* **130**, 2767—2777.

[16] Yao, F., Svensjo, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C., and Eriksson, E. (1998) Tetracy-Cline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1939—1950.

[17] T-REx™ System (1999), in *Expressions*, Vol. 6, Invitrogen Newsletter, pp. 2—3.

[18] Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761—771.

[19] Kuechle, M. K., Presland, R. B., Lewis, S. P., Fleckman, P., and Dale, B. A. (2000) Inducible expression of filaggrin increases keratinocyte susceptibility to apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **7**, 566—573.

[20] Haydock, P. V., Blomquist, C., Brumbaugh, S., Dale, B. A., Holbrook, K. A., and Fleckman, P. (1993) Antisense profilaggrin RNA delays and decreases profilaggrin expression and alters in vitro differentiation of rat epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 118—126.

[21] Baden, H. P. and Kubilus, J. (1983) The growth and differentiation of cultured newborn rat keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **80**, 124 130.

[22] Baden, H. P., Kubilus, J., Wolman, S. R., Steinberg, M. L., Phillips, S. B., and Kvedar, J. C. (1987) NM1 keratinocyte line is cytogenetically and biologically stable and exhibits a unique structural protein. *J. Invest. Dermatol.* **89**, 574—579.

[23] Baden, H. P., Kubilus, J., Kvedar, J. C., Steinberg, M. L., and Wolman, S. R. (1987) Isolation and

characterization of a spontaneously arising long-lived line of human keratinocytes (NM 1) . *In Vitro Cell Dev. Biol.* **23**, 205—213.

[24] Rhim, J. S. , Jay, G. , Arnstein, P. , Price, F. M. , Sanford, K. K. , and Aaronson, S. A. (1985) Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by AD12-SV40 and Kirsten sarcoma viruses. *Science* **227**, 1250—1252.

[25] Tsao, M. C. , Walthall, B. J. , and Ham, R. G. (1982) Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cell Physiol.* **110**, 219—229.

[26] Jiang, C. K. , Connolly, D. , and Blumenberg, M. (1991) Comparison of methods for transfection of human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 969—973.

[27] Gossen, M. and Bujard, H. (1993) Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4411—4412.

第 30 章 角质形成细胞中寡核苷酸介导的基因打靶

Olga Igoucheva，Kyonggeun Yoon

摘 要：寡核苷酸介导的基因改造在哺乳动物细胞的基因组中只引起目的脱氧核糖核酸序列的低频率改变，且只有高灵敏度的方法才可以检测得到。为了检测此低频率的基因改变，我们已建立了一个利用突变 LacZ 载体的试验，该载体在 *LacZ* 基因中只含有一个单一的点突变，但结果可导致酶失去活性。然而当含有这一突变报告基因的细胞被基因打靶修复，突变的 β-半乳糖苷酶活性得以恢复，而且用组织化学染色可见到被修复的细胞。尽管原代人角质形成细胞对寡核苷酸具有高效的核摄取，但采用这种方法我们只检测到低水平的基因校正。因此，为了成功地校正基因，考虑许多其他因素是非常重要的，包括 DNA 修复和重组活性、复制和转录的状态，以及早已熟知的寡聚脱氧核苷酸的特性及其向细胞的传递。处理表皮干细胞的现有方法及皮肤组织的可及性可使得表皮成为基因打靶的热点。考虑到该技术的低效率，采用表皮干细胞进行基因修复细胞的一般筛选操作和扩增可最终使基因修复技术变得更为实用。

关键词：角质形成细胞；基因打靶；校正频率；寡聚脱氧核苷酸；报告基因

1 导言

基因治疗这一迅速发展的领域，为治疗遗传和获得性疾病带来更多希望。为了进行成功的治疗，基因必须有效地递送到靶细胞，且基因产物必须在体内长期表达并对宿主无害。当前，有两种方法可达到这一目的：一种是体内策略，基因直接转移到宿主器官；另一种是活体外途径，即通过获取细胞、培养以进行基因的传递和筛选再返回宿主。然而一些问题始终阻碍基因治疗安全有效地使用，进一步研究面临的主要技术挑战包括转移基因的短暂表达、移植细胞的有限存活，以及基因转移到干细胞的困难。

表皮是检测和开展不同形式的基因治疗的理想系统，因为它易于获得并可用于治疗因子的局部或系统递送。处理区域可以被密切监护，并可与同一生物体内的未处理区域相互比较。若欲终止处理，遗传上修饰的组织可以很容易被去除。复层扁平表皮是持续更新的组织，由增殖的基底层中角质形成细胞分裂取代脱落的上层已分化的角质形成细胞来维持[1]。培养表皮自体移植用于治疗烧伤患者的长期成功表明干细胞治疗是可行的[2,3]。角质形成细胞具有高更新率，小鼠 7～10 d，人大约 30 d[4]。因此，在自我更新组织如皮肤表皮中，基因治疗的途径必须针对干细胞群，并且需要对干细胞进行鉴定、扩增及打靶以保证转入基因的持续表达。表皮同样适于体外技术，因为角质形成细胞可以被培养，并用来进行转入基因表达的筛选，还可通过移植转回给供者。另外，如果转入的基因编码一种分泌蛋白，则培养的角质形成细胞移植后将长期分泌该蛋白质[5]。因

此，正在表皮角质形成细胞中进行最佳基因治疗策略的试验，期望用来治疗显性和隐性遗传病，以及获得性皮肤疾病。表皮基因治疗虽处于早期阶段，但是其最终的临床应用前景十分广阔。

很多不同的病毒载体可用于高效的基因传递。为了取代有缺陷的基因，病毒载体必须包括整个基因或 cDNA，以及一些对基因表达非常重要的调控区的完整拷贝。整合病毒颗粒（逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒）介导的基因传递，可提供长期表达，因为转入的基因可永久整合到宿主染色体[6]。尽管由病毒介导的基因向临床应用推进上已取得了令人难忘的进展，但也存在不少问题。例如，逆转录病毒感染需要细胞分裂，因此限制了对慢分裂周期的干细胞的感染[7]，而且也一直难以产生出稳定的高滴度病毒，以便有效地用于体内感染[8]。一些研究还表明尽管载体 DNA 完好存在，但病毒启动子所驱动的转入基因表达却逐渐失活[9]。还有一涉及安全的忧虑是可能产生具有复制活性的逆转录病毒[10]，例如，病毒的随机整合还能激活致癌基因或使肿瘤抑制基因失活[11]。虽然腺病毒传递系统的优点在于其感染不需要靶细胞分裂且可产生高滴度的病毒[12]，但是腺病毒载体更易于感染不复制的终末分化细胞，因而限制了其在这些细胞过渡时期的表达。此外，感染的细胞可成为免疫系统的靶点而被清除出体外，高滴度的腺病毒用于临床可引起急性免疫反应，对宿主有害。

考虑到使用病毒载体面临的困难，开展用于皮肤基因治疗的其他方式是非常必要的。已建立出几种通过同源重组纠正突变的基因打靶策略，这样在纠正突变的同时又保持了对于基因的适当表达和调控很重要的复杂基因组结构。采用双链 DNA 的传统基因打靶策略有可能取代或敲除染色体的遗传信息，而通过筛选很少成功的靶向产物可以将这一策略应用于胚胎干细胞[13]。另一可选择的方法是通过偶联活性化学基团的可形成三螺旋结构的寡核苷酸进行靶向基因突变，可形成三螺旋结构的寡核苷酸识别靶向碱基附近的序列，活性基团化学修饰靶向核苷酸或导致 DNA 修复[14]。小片段同源替代策略采用 300～400 个碱基的单链核苷酸可在哺乳动物细胞中产生约 1%的同源替代[15]。还有一种方法包括由两种不同的结构域组成的双功能寡核苷酸，三螺旋区域可结合目的碱基附近的序列，修复结构域含有与目的碱基错配的序列[16]。近年来，腺相关病毒载体已被用来修饰同源染色体的序列，其在正常人细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶（HPRT）位点上的打靶效率接近 1%[17]。尽管这些方法的每一种成功使用的案例有限，但由于同源重组的效率仍然很低，因而使用仍受到严格限制。

目前，我们实验室着重开展使用相对短的单链寡聚脱氧核苷酸（ODN）针对单个点突变的位点特异性校正的实验策略。这些研究包括建立敏感及可重复的分析方法以评价哺乳动物细胞中基因校正的频率，以及提高打靶频率的机制性研究。针对这些目标，已经建立了两种分析系统通过基因校正、突变的 *LacZ* 及突变的酪氨酸酶用来检测表型的改变。两种系统都可证实在一些哺乳动物细胞的游离基因及染色体中通过 ODN 进行基因校正，如 CHO-K1[18]、原代人角质形成细胞[19]、黑素细胞[20]及小鼠胚胎干细胞[21]。在最近的实验中，我们设计了分别改变酪氨酸酶及 *c-kit* 基因的两种 ODN，它们能够导致单个白化小鼠黑素细胞中这两种基因同时被修正[20]。我们的结果表明在一个具有“修复-活性”细胞核中如果同时存在两种 ODN，则双重打靶事件发生的频率相对较高。这一策略可以使用筛选操作来克服基因校正的低频率和目前基于寡核苷酸基因打靶的限制。

这一章我们将特别描述高效基因打靶的每一关键问题：靶向 ODN 的设计、ODN 递送的效率、细胞中 ODN 的稳定性，转染前、转染中及转染后细胞的培养条件及基因校正的鉴定。

1.1 ODN 的设计

我们最近的研究表明在哺乳动物细胞的单个碱基点突变定向改造中，短 ODN 显示出与嵌合性 RNA-DNA 寡核苷酸（RDo）相似或比其更高的活性[18,20]。因为 ODN 的合成及纯化相对容易，所以在基因改造中 ODN 的使用比其他合成寡核苷酸更好。长度为 45 nt 的 ODN 具有最高活性，由与编码序列互补的序列组成，不包括与靶向碱基的单个错配（图 30.1）。为了提高哺乳动物细胞中 ODN 的稳定性，ODN 的 5′端和 3′端均掺入 4 个 2′-*O*-甲基尿嘧啶残基而给以保护。依据我们的经验，两端掺入磷硫酰基因打靶的效率较低。这些 ODN 在哺乳动物细胞中相对稳定，转染 24 h 后小部分损伤的 ODN 可恢复成完整的全长 ODN[18]。

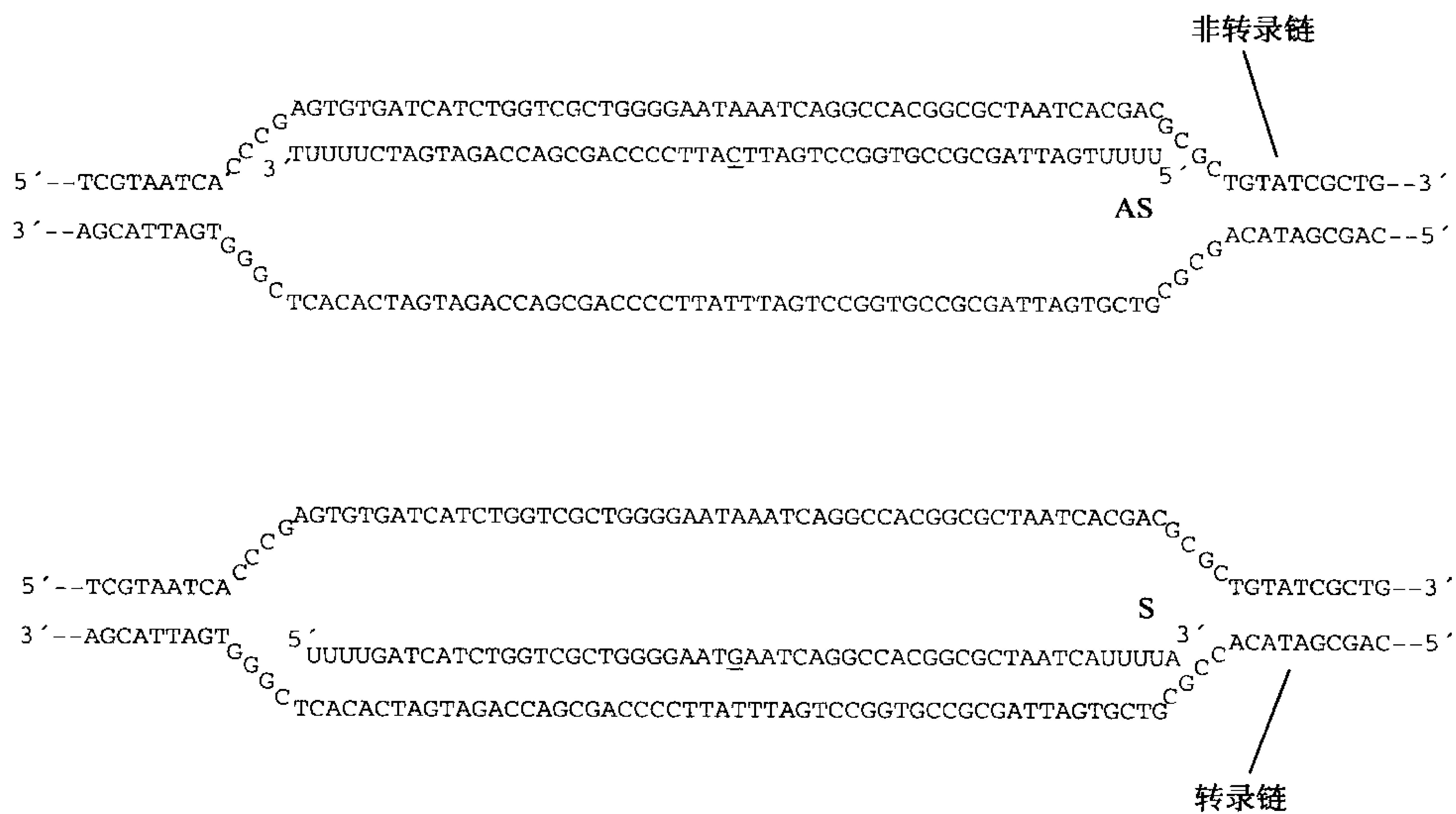


图 30.1　反义（AS）和正义（S）ODN 与突变 *LacZ* 序列之间的假定媒介物

设计的这两种 ODN 在靶向碱基（画线部分）掺入单个位点错配以恢复突变的 β-半乳糖苷酶的活性。假定 AQ 双链靶序列与分别产生错配 A：C 及 G：T 的 AS 和 S ODN 互补。

1.2 ODN 的递送

近年来已经引入了一系列高效的阳离子脂质体试剂。使用阳离子脂质体减少了 DNA 分子的负电荷，以利其穿越细胞膜。DNA 同样诱导阳离子脂质体融合，可能是由于通过桥接两脂质体，使它们靠近，并使双分子层失稳。这一致融合特性为 DNA 进入新的脂质体或者 DNA 与细胞膜的净负电荷相联以传递 DNA 提供机会[22]。脂质体的效率似乎依靠很多变量：细胞类型、类脂膜组分、脂质与 DNA 的相对比例、ODN 的内吞作用、ODN 从内含体的释放、核转运，以及在这些过程中 DNA-脂质复合物的稳定

性。ODN 的传送需要通过检测许多可获得的脂质体并针对每一细胞类型进行优化。脂质体难以将 ODN 传送入大多数人来源的原代细胞，与此相反，在人原代角质形成细胞中即使没有脂质体也能高效递送 ODN[23]。我们已经能够达到核 ODN 的稳定高效传递[19,24]。角质形成细胞可能通过受体介导的内摄作用或形成胞饮小体从而具有吸收 ODN 的能力。暴露于 ODN 的正常人角质形成细胞以非序列特异性的方式诱导包括白细胞介素 1α 和卵泡抑素在内的一些基因表达[25]。虽然已有推测进入细胞内的 ODN 可与细胞内受体结合（如 Toll Like Receptor-9）介导信号转导，在角质形成细胞中这一有效 ODN 传送的机制还没有完全阐明。

1.3 采用 ODN 成功基因打靶的必要条件

由于 ODN 能被大量传递到核内，所以最初我们期待在角质形成细胞中 ODN 能有效进行基因改造。然而，组织培养中的角质形成细胞通过 ODN 进行的基因校正水平很低，基于常规 PCR 的限制性酶切片段长度多态性（RFLP）[24] 和免疫荧光[26] 均不能对此进行检测。RFLP 分析不能检测低于 5%的频率，并且在扩增过程中还会受到由退化 RDO 引起的 PCR 人为产物所影响。因此，发展一套能检测低频率的高敏感度系统很有必要。1999 年我们构建了 *LacZ* 基因中含单个点突变（G1651A）的 *LacZ* 突变载体，可通过氨基酸置换（E523K）而引起酶活性的丢失，但当含有这一突变报告基因的细胞如果通过基因打靶被校正，则突变的 β-半乳糖苷酶的酶活性被恢复，而且免疫组织化学染色可见显示被校正的细胞。这一突变的 LacZ 系统有助于发展基因修复策略，它通过为基因校正提供容易检测及量化的标记，使用核提取物、游离基因、哺乳动物细胞的染色体进行生物化学研究[18,27]。使用突变的 LacZ 载体，我们建立了一种体外反应，它能够检测给定类型细胞中的基因修复活性[18,27]。这种通过核提取物进行的体外反应在对给定类型细胞基因打靶的可行性预测方面很有价值，因为在体外基因修复活性与染色体基因修复活性之间存在很好的相关关系[18,27]。与 CHO-K1 和 DT40 细胞相比，从人原代角质形成细胞中分离的核提取物显示较低的基因校正水平，表明角质形成细胞可能不具备为 ODN 介导的基因改造所需的强大的同源重组能力或 DNA 修复活性。

为了检测低频率，有必要建立敏感的检测系统，以期对靶基因修复进行无背景的精确评分。我们已经利用了突变的 *LacZ* 系统达到此目的，同时也可以对编码耐药标记（新霉素、嘌呤霉素）或绿色荧光蛋白等的其他基因进行打靶。重要的是必须通过定向诱变导入的单个点突变造成报告基因突变，致使酶活性完全丧失。另外，载体必须包含一个附加的筛选标记以便富集包含突变报告基因的细胞。这一突变报告基因可通过 DNA 转染或逆转录病毒导入细胞。逆转录病毒感染更为可取，因为它比转染的效率更高，并可把单个或低拷贝的转基因整合到染色体。我们通过与纽约大学的 Lorne Taichman 博士合作已经把带有突变 *lacZ* 的逆转录病毒转入人原代角质形成细胞，利用这些角质形成细胞，我们观察到低水平的基因校正。尽管事实上 80%～90%的角质形成细胞表现出高效的核摄取（图 30.2），但每 10^6 个细胞中只有 5～10 个蓝色细胞，与我们以往的发表数据一致[24]。因此，成功的基因修复还应考虑许多其他因素，这是非常重要的，除已知的需求如 ODN 的质量和可向细胞的递送之外，还包括 DNA 修复和重组活性、复制和转录的状态。

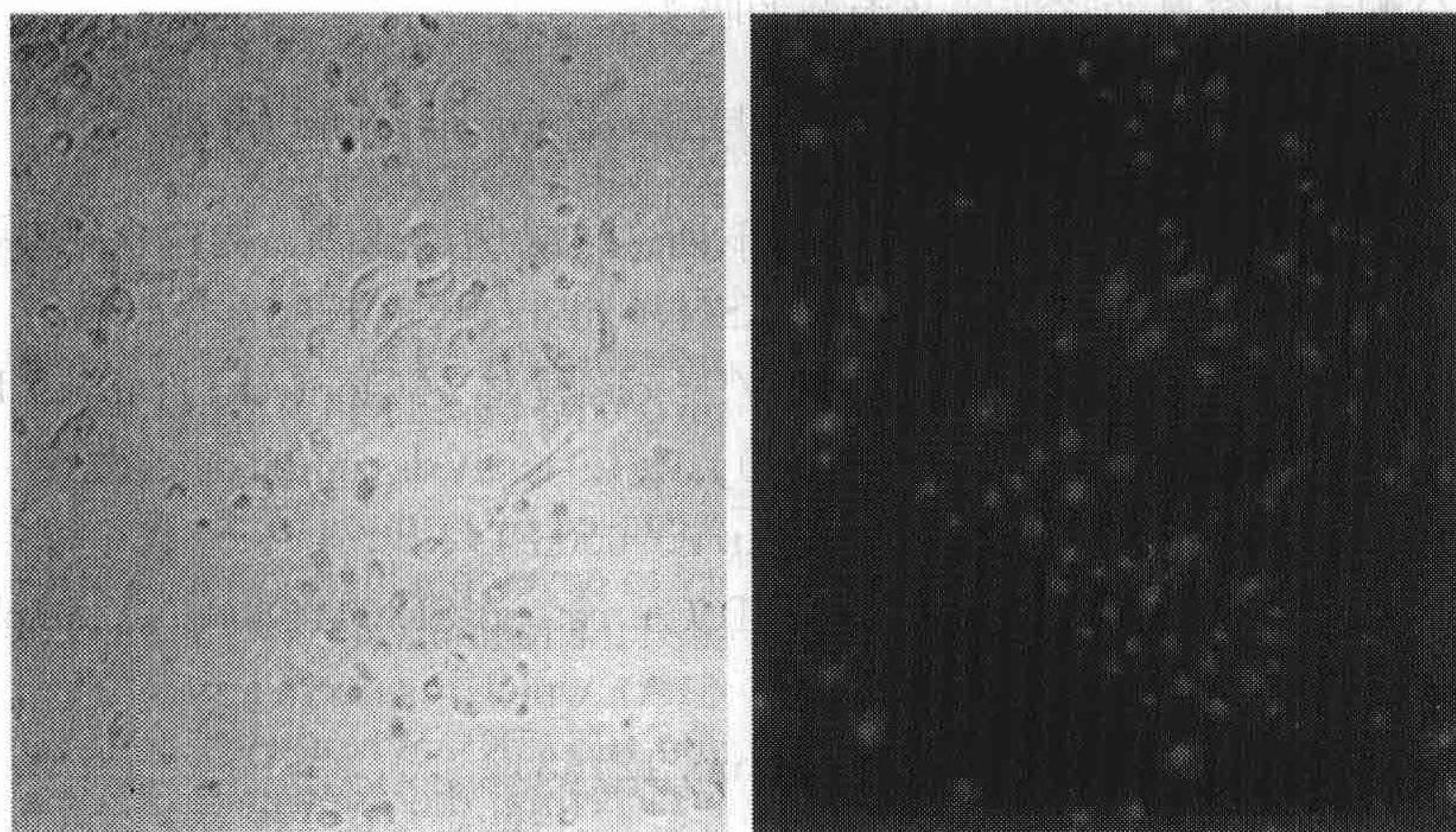


图 30.2　突变 *LacZ* 逆转录病毒感染的人原代角质形成细胞摄入的荧光素偶联寡核苷酸

2　材料

2.1　角质形成细胞分离及培养

（1）包皮组织。

（2）原代人角质形成细胞培养。

（3）冷冻储存的细胞应保存于液氮，这些储存物必须是传代次数最少的细胞。

（4）含有必需生长因子和补充物的合适细胞培养基。推荐 EpiLife 的无钙培养基和人角质形成细胞生长补充物（Cascade Biologics，Portland，OR，cat. no. M-EPI-500；cat. no. S-001-5）。

（5）无钙、镁离子的磷酸盐缓冲盐溶液（DPBS）（Cambrex；cat. no. 17-512F）。

（6）0.25%的胰蛋白酶-乙二胺四乙酸混合物（Cambrex；cat. no. 17-161E）。

（7）抗生素：100U/ml 青霉素 G，100 μg/ml 链霉素，2.5 μg/ml 两性霉素 B 溶于 1× DPBS。

（8）100%乙醇。

（9）台盼蓝溶液：0.4%（Cambrex；cat. no. 17-942E）。

（10）10 cm 组织培养皿，6 孔板及所有规格的移液器。

（11）血细胞计数器。

（12）组织培养超净工作台。

（13）无菌冻存管（Nalgene；cat. no. 5000-0020）及二甲基亚砜（Sigma；cat. no. D2650）。

（14）倒置显微镜。

（15）Sorval 离心机。

（16）无菌 15 ml 一次性的离心管。

(17) 可分配大小容量的移液器及无菌的吸头。

2.2 角质形成细胞的逆转录病毒感染及转导细胞的鉴定

(1) 从 Clontech (Palo Alto, CA) 获得下列逆转录病毒载体。构建含靶基因的逆转录病毒载体：pLNCX (cat. no. K 1060-C)，pLXSN (cat. no. K 1060-B)。

(2) 四环素 (Tc) 可调控载体：RevTet-on 载体 (Clontech; cat. no. K 1659-1)，RevTet-off 载体 (Clontech; cat. no. K 1640-1)。

(3) 自身灭活载体：pSIR (Clontech; cat. no. 6003-1)。

(4) 基于 293 的包装细胞：φNX-eco (ATCC; cat. no. SD-3444)，φNX-ampho (ATCC; cat. no. SD-3443)。

(5) QIAGEN Maxi Prep 试剂盒 (cat. no. 12163)。

(6) CalPos Maximizer™ 转染试剂盒 (Clontech; cat. no. K 2050-1)，ProFection mammalian Transfection System 磷酸钙 (Promega; cat. no. E 12)。

(7) 哺乳动物细胞筛选试剂：新霉素 (FisherBiotech; cat. no. BP673-1)，嘌呤霉素 (Sigma; cat. no. 82595)。

(8) 磷酸盐缓冲盐溶液 (DPBS)。

(9) 1, 5-二甲基-1, 5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物 (聚凝胺, Polybrene) 溶液 (Sigma; cat. no. H9268)。

(10) Phase Lock Gel 管 (PLG, Eppendorf; cat. no. E0032005. 152)。

(11) 用于报告基因活性分析的染色液。

(12) 无菌 1.5 ml 一次性离心管。

(13) 凝胶电泳仪器和试剂，例如琼脂糖、0.5× TBE 电泳缓冲液、0.25 mol/L HCl、0.5 mol/L NaOH、50 mmol/L NaOH、10× 枸橼酸钠缓冲液和溴化乙锭。

(14) UV Stratalinker 2400 交联仪 (Stratagene, La Jolla, CA)。

(15) PCR 仪 (Thermocycler)。

(16) 限制性内切核酸酶。

(17) Southern 印迹和 Northern 印迹测定的试剂：细胞裂解缓冲液 [100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3～8.5, 5 mmol/L EDTA, 200 mmol/L NaCl, 0.2%十二烷基硫酸钠 (SDS)]；苯酚/氯仿/异戊醇；异丙醇，Zeta-Probe GT 印迹膜 (Bio-Rad; cat. no. 163754A)；杂交液 (0.25 mol/L 磷酸钠 pH 7.2 和 7% SDS)；洗脱液 (20 mmol/L 磷酸钠 pH 7.2, 5% SDS, 20 mmol/L 磷酸钠 pH 7.2 和 1% SDS)；*X* 射线片 (Kodak; cat. no. 165 1579)；杂交仪 (Robbins Scientific, model 310)。

(18) Megaprime DNA 标记系统 (Amersham; cat. no. RPN 1606/7)。

(19) RNeasy RNA 提取试剂盒 (Qiagen; cat. no. 74104)。

(20) 蛋白质印迹检测试剂：SDS-PAGE 凝胶含 7% 分离胶 [30%丙烯酰胺/ 8%双丙烯酰胺；1.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.85～8.9；10% SDS；10% 过硫酸铵 (APS)；5 μl TEMED] 及 4% 浓缩胶 (30% 丙烯酰胺/8% 双丙烯酰胺，0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.7；10% SDS；10% APS；5 μl TEMED)。

(21) 细胞裂解缓冲液：50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1% 脱氧胆酸钠，1%

Triton X-100，0.1%SDS，0.15 mmol/L NaCl，1.5 mmol/L EDTA 和蛋白酶抑制剂［1 mmol/L 苯甲基磺酰氟化物（PMSF），10 μg/ml 亮抑酶肽（leupeptine），10 μg/ml 抑肽酶（aprotinine)］。

（22）Laemli 缓冲液：50%0.5 mol/L Tris-HCl，pH 6.8；4% SDS；10% β-巯基乙醇；40% 甘油。

（23）电印迹仪（Pharmacia Biotech）。

（24）TTBS 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4；0.1% Tween-20；150 mmol/L NaCl。

（25）封闭液：3%～5%牛血清白蛋白（BSA）溶于 1× TTBS 缓冲液。

（26）BCIP/NTB 片剂（Sigma；cat. no. B-5655）。

2.3 基因打靶程序

（1）先前已列举的培养角质形成细胞所需要的一些材料。

（2）分光光度计。

（3）台式低温离心机。

（4）凝胶电泳仪和试剂。

（5）倒置显微镜。

（6）荧光显微镜。

（7）无菌蒸馏水。

（8）用高效液相色谱仪纯化并除去盐分的靶向寡核苷酸：ODN 应溶解在无菌水或 TE 溶液中。为基因打靶实验，最终 ODN 浓度应约 1 μg/μl。

（9）转染试剂：FuGENE 6（Roche；cat. no. 1 814 443）。

（10）选择性 MEMI 培养基（Gibco；cat. no. 51985-034）。

（11）盖玻片和载玻片。

（12）变性 12%丙烯酰胺凝胶：0.6 g 丙烯酰胺，0.03 g 双丙烯酰胺，2.1 g 尿素，0.5 ml10× TBE，2.0 ml 甲酰胺，0.8 ml 水。以上可制备 5 ml 12%丙烯酰胺凝胶。

（13）酸性洗液：1 mol/L NaCl，HAc，pH 2.5。

（14）固定液：1% 戊二醛溶液（Sigma；cat. no. G-6257）。

（15）3.7% 多聚甲醛溶液。

（16）Vectashield 封固剂（Vector Laboratories；cat. no. H-1000）。

2.4 校正事件的鉴定

（1）角质形成细胞培养和转染角质形成细胞鉴定所列的一些材料也为校正事件的鉴定所需要。

（2）如要进行筛选，则需要合适的选择培养基。

（3）固定液：1% 戊二醛溶液（Sigma；cat. no. G-6257）。

（4）报告基因活性分析染色液：2 mmol/L $MgCl_2$，5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$，5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$，0.5 mmol/L X-gal。

（5）提取基因组 DNA 需要的材料。

（6）PCR-RFLP 分析需要的材料和试剂：PCR 缓冲液，适当的引物，AmpliTaq Gold with GeneAmp 聚合酶（Roche；cat. no. N808-0247），限制性内切核酸酶。

（7）提馏溶液：0.1× 标准枸橼酸盐水（SSC）和 0.5% SDS。

（8）抗 β-半乳糖苷酶单克隆抗体（Promega；Madison，WI；cat. no. Z3781）。

（9）碱性磷酸酶标记的抗小鼠二抗（Promega；Madison，WI；cat. no. S3721）。

3　方法

3.1　角质形成细胞的分离和细胞培养

3.1.1　从包皮中分离原代人角质形成细胞

（1）将包皮组织放入置于冰上的 EpiLife＋HKGS 培养基中直到进行操作。用无菌器械在层流通风橱中进行所有操作。

（2）用 5 ml 抗生素溶液洗组织。

（3）将组织从抗生素溶液中移出，放入置于冰上的 100%乙醇中，1 min。然后再用抗生素溶液清洗组织 10 min。

（4）将组织剪成小碎片（越小越好），把它们转移到 5 ml 消化液中。

（5）37℃剧烈振动试管 30 min。

（6）室温放置 3 min，不要振荡，让组织碎片沉降。

（7）移去含有角质形成细胞的消化液，不打乱组织碎片。将细胞悬液/消化液转到置于冰上的新管中。

（8）加入 5 ml 新鲜消化液于组织碎片中，再孵育 30 min，37℃剧烈振荡。

（9）每一组织重复步骤（5）～（7）三次，将包含角质形成细胞的细胞裂解液/消化液加入先前冰上保存的细胞悬液中，以制备总量为 15 ml 的细胞悬液。

（10）沉淀角质形成细胞（325 *g*，10 min，4℃）。

（11）转移消化细胞至含有 EpiLife＋HKGS 培养基的 10 cm 培养皿，继续培养直至细胞铺满汇合。

3.1.2　角质形成细胞的培养

为了保持角质形成细胞处于未分化状态，细胞应该以尽可能少的时间悬浮在液体中。分离角质形成细胞时应尽快操作。如果胰蛋白酶消化比所指示的时间短，那么立即进行下一步操作。

（1）温热胰蛋白酶至 37℃。

（2）吸去 10 cm 组织培养皿中的所有培养基。

（3）可选用室温 DPBS 冲洗细胞。

（4）加入 3 ml 胰蛋白酶，保证完全覆盖培养皿。

（5）37℃准确地孵育培养皿 5 min。

（6）显微镜下观察确保 95%以上的细胞为圆形。

（7）用培养皿猛击手掌或显微镜平台，保证所有的细胞从平皿表面分离。

(8) 于正在消化的细胞培养皿中迅速加入 7 ml 含 10%血清的 1× DPBS 使胰蛋白酶失活。吸管反复吹吸以吹散细胞团块，再重悬细胞。动作要迅速。

(9) 将全部 10 ml 液体转移到 15 ml Falcon 管中。如果 50%以上的细胞依然贴壁，用 DPBS 漂洗细胞两遍，并重复步骤 (1)～(9)。

(10) 100 *g* 离心细胞 4 min。

(11) 吸弃上清液，用 10 ml 1× DPBS 重悬沉淀，并清洗细胞。

(12) 100 *g* 再次离心细胞 4 min。

(13) 吸弃上清液并用 EpiLife+HKGS 培养基重悬细胞。10 ml 为重悬的最佳用量。如果需要细胞计数，取 100 μl 的细胞悬液加入等量的台盼蓝。将 10 μl 的此混合液加入血细胞计数器，计数两个大方格中的细胞。利用下列公式计算细胞数量：$X/2\times2\times10^4=Y$ 细胞/ml；X 为细胞计数值，2 为稀释倍数（$X/2$ 中的 2 是用于计数的方格数），Y 为每毫升的细胞数。

(14) 一般来说，细胞 1∶3 传代（1∶2 或 1∶4 也常用）。若是如此，转移约 3.3 ml 的细胞悬液于另一 10 cm 的培养皿，并加入大约 6 ml 的 EpiLife+HKGS 培养基。

(15) 通常细胞每周传代一次，隔天换液一次。通常在细胞完全铺满之前传代。不要将细胞在同一培养皿上培养超过 10 d 。

3.1.3 角质形成细胞的冻存

(1) 当细胞 80%～90%汇合时，按前述 3.1.2 中的步骤 (1)～(12) 用胰蛋白酶消化。

(2) 趁细胞正在离心，将 2 ml 无菌冻存管置于冰上。

(3) 准备含 5%～10%DMSO 的 EpiLife+HKGS 培养基。

(4) 重悬细胞沉淀于含 DMSO 的培养基中，细胞密度为 10^6 个细胞/ml。

(5) 每管加入 1～1.5 ml 的细胞悬液，-20℃ 保持约 2 h。

(6) 放置试管于-80℃过夜，第二天保存于液氮中。

3.2 角质形成细胞的逆转录病毒感染和转导细胞的鉴定

3.2.1 带报告基因的逆转录病毒载体的构建及重组病毒的产生

最近，我们发表的论文详细描述了有关逆转录病毒将外基质基因传送给哺乳动物细胞的实验方法[28]。你能够从中找到关于逆转录病毒载体、包装细胞、病毒产生和感染的特定的技术细节，而这里只简要描述一些重要特征。我们利用的是突变的 *LacZ* 系统，也可用其他的药物抗性基因（新霉素、嘌呤霉素）或编码绿色荧光蛋白的基因代替。这些基因必须由靶点导向突变导入单个位点的突变，造成酶活性的完全失活。另外，逆转录病毒载体应当含有另一可筛选的标记，可用来富集含突变报告基因的细胞。

(1) 通过常规的克隆操作构建含有选定突变报告基因和可选择标记的逆转录病毒载体。

(2) 进行各种诊断性限制性内切核酸酶消化以鉴定构建的质粒。

(3) 用 QIAGEN Maxi Prep 试剂盒大规模制备重组逆转录病毒载体。

（4）用含有 DMEM/10%胎牛血清和 1%谷氨酰胺的生长培养基维持 φNX 包装细胞，每 3～4 d 按 1∶4 或 1∶5 传代。细胞达到 40%～50%融合时转染效率高。

（5）转染前用新鲜培养基培养细胞。

（6）依照操作说明书制备转染混合液。

（7）将转染混合液轻柔并迅速地逐滴加到有培养基的细胞上，然后将培养皿前后晃动以均匀分散 DNA/磷酸钙颗粒。

（8）第 2 天加入 5 ml 新鲜培养基。

（9）24～48 h 后，收集分泌至培养基中的病毒。

（10）1000 *g* 离心病毒上清液 5 min，沉淀细胞碎片，再用 0.45 μm Millipore 滤器过滤上清去除细胞。此时，病毒已经可供使用。病毒上清液可在－80℃冻存以备后用，但是反复冻融，病毒滴度会降低。

3.2.2 以重组逆转录病毒感染角质形成细胞

（1）每个 60 mm 培养皿接种 2.0×10^5 个角质形成细胞，加入 2 ml EpiLife＋HKGS 培养基。感染时细胞应该处在对数生长期。

（2）在盛有 1 ml 生长培养基的培养皿中，加入 1，5-二甲基-1，5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物溶液，其终浓度为 4 μg/ml。

（3）给细胞加入 1 ml 病毒悬液，37℃继续孵育。如果有必要，参考列出的步骤[28]滴定病毒。通常推荐以 5～10 的感染比（病毒颗粒数量/细胞数）进行感染。

（4）转染 24 h 后，去除病毒液，更换 5 ml 新鲜培养基以培养细胞。

（5）24～48 h 后，细胞可以用于病毒转导的测定。如果需要筛选，根据病毒载体加入或去除抗生素。

3.2.3 转导角质形成细胞的鉴定

通常，在打靶实验之前需要分离一些克隆，并分析突变报告基因和蛋白质的存在和表达。Southern 印迹用来确定转基因的拷贝数，Northern 印迹和蛋白质印迹检测基因的表达。然而，原代人角质形成细胞的生命周期有限（通常用 EpiLife 培养基培养最多 10～15 代），难以对角质形成细胞进行克隆分析。这种情况下，可以将筛选出的细胞混合，用 Northern 印迹和蛋白质印迹分析鉴定基因的表达。

3.2.3.1 Southern 印迹分析

（1）在 1 ml 1× DPBS 中用细胞刮将细胞从培养皿中刮下，收集，100 *g* 离心 7 min。

（2）在含蛋白酶 K（终浓度 200 μg/ml ）的消化液中溶解细胞沉淀。

（3）将细胞溶解物转移到 Phase Lock Gel 管中，加等量且已平衡过的苯酚/氯仿/异丙醇（25∶24∶1），将 PLG 管放在摇床上轻微振荡 5 min。

（4）台式离心机室温 16 000 *g* 离心 5 min 使之分成两相。PLG 将形成水相和有机相之间的分界。

（5）加入等体积的氯仿/异戊醇（24∶1），轻微振荡 5 min。

（6）离心同前。

(7) 小心移去水相，加入等体积的异丙醇来沉淀基因组 DNA。混合溶液直至丝状物变成紧密的结或凝块。

(8) 室温以最大转速将试管离心 1 min。

(9) 用 70%乙醇清洗沉淀一次，再次离心大约 1～2 min。

(10) 倒出乙醇，将管倒置于清洁纸巾上，空气中干燥。

(11) 用 50 μl 蒸馏水重悬 DNA 沉淀。静置 5～10 min，上下吹打直至变黏稠。基因组 DNA 可保存在 4℃，但不超过 2～4 个月。

(12) Southern 印迹：以适当的限制性内切核酸酶消化 10 μg 基因组 DNA，产生的片段位于导入的报告基因内。为了计算拷贝数，用限制性内切核酸酶消化基因组 DNA（通常用 *Hin*dIII），且突变报告基因的编码区仅有一个此酶切位点。

(13) 用 0.5× TBE 缓冲液在 0.7%琼脂糖凝胶上对酶切的基因组产物进行电泳，100 V，1.5～2 h。

(14) 用含 0.25 mol/L HCl 的溶液浸泡胶 15 min。

(15) Milli-Q 去离子水漂洗两次。

(16) 用含 0.5 mol/L NaOH 的溶液使胶变性 30 min。

(17) 在 10× SSC 溶液中中和胶 90 min。

(18) 转移 DNA 到 Zeta-Probe 印迹膜。转移之前，用 Milli-Q 水预湿膜 2 min，然后加入 10× SSC 转移缓冲液，用真空转移仪将 DNA 转至膜上。

(19) 用 UV Stratalinker 2400 交联仪将已转移的 DNA 与膜（两侧）交联。

(20) 在含有 0.25 mol/L 磷酸钠（pH7.2）和 7% SDS 的缓冲液中预杂交已固定核酸的膜，65℃，30～45 min。

(21) 除去预杂交液，用含有变性放射性标记探针（95℃ 5 min）的相同缓冲液替代。用 Amersham 的 Megaprime DNA 标记系统可以制备放射标记的 DNA 片段。通常，在含1×10^6cpm/ml 的杂交液中进行杂交。

(22) 用杂交保温箱，轻柔旋转，65℃杂交 16～18 h。

(23) 以含 20 mmol/L 磷酸钠（pH7.2）和 5%SDS 的缓冲液在 65℃洗膜两次，每次30～60 min。根据杂交信号调整漂洗时间。

(24) 用含 20 mmol/L 磷酸钠（pH 7.2）和 1% SDS 的缓冲液在 65℃再洗膜一次，30～60 min。

(25) 用 X-OMAT AR 胶片放射自显影检测杂交信号［见注意事项（1）］。

3.2.3.2 Northern 印迹分析

(1) 用 Qiagen 的 RNeasy 试剂盒提取总 RNA。这一试剂盒能快速简便地从哺乳动物细胞中提取高质量的 RNA，可达 100 μg。

(2) 用含甲酰胺的 1%变性琼脂糖凝胶电泳 20 μg 总 RNA。

(3) Milli-Q 水漂洗凝胶两次。

(4) 用 50 mmol/L NaOH 浸泡 RNA 凝胶 5～15 min，根据 mRNA 的大小确定浸泡时间。

(5) 按 Southern 印迹分析 3.2.3.1 中概括的步骤（19）～（25）进行操作。

3.2.3.3 蛋白质印迹分析

(1) 首先制备 SDS-PAGE 凝胶。

(2) 准备胶的同时，在裂解液中消化细胞。

(3) 收集细胞溶解物，8000～10 000 g 离心 10 min。上清液中含有蛋白质。

(4) 一旦浓缩胶聚合，准备样本，将溶解产物和 Laemli 缓冲液按 3∶1 混合。

(5) 95℃加热样本 3～5 min，冷却至室温。

(6) 上样，15 mA 电泳。当蛋白质到达分离胶时，调整电流至 25 mA。电泳越慢，分辨率越好。

(7) 用电印迹仪将蛋白质从胶中转移至硝酸纤维素膜上。根据胶的大小（大约 0.8 mA/cm）及目的蛋白的大小确定电转的恒定电流。小分子质量的蛋白质（10～50 kDa）40～50 min 已足够，大分子质量的蛋白质（60～200 kDa）80 min 即可。

(8) 一旦转移完成，将硝酸纤维素膜放入 1× TTBS 缓冲液中漂洗 1～2 min。为了防止非特异结合，将膜放入封闭液，室温孵育 30 min。

(9) 倒出封闭液，加入用含 3%～5%牛血清白蛋白的新鲜 TTBS 适当稀释的一抗。孵育时间 1 h 或 4℃过夜 [见注意事项 (2)]。

(10) 孵育后，倒出一抗，加入足量的 TTBS 溶液覆盖膜，室温振荡 5 min。重复两次。

(11) 加入含适当稀释二抗的封闭液，室温孵育 1 h [见注意事项 (3)]。

(12) TTBS 缓冲液洗膜三次，每次 5 min。

(13) 用合适的底物检测二抗，如 BCIP/NTB 片剂。

3.3 基因打靶的步骤

3.3.1 ODN 的特点

用于打靶实验的 ODN 或许是最重要的试剂，因此验证 ODN 的大小和纯度非常重要。通常，寡核苷酸由标准的亚磷酰胺程序合成，再用高效液相色谱仪纯化。打靶实验前，应在变性胶上电泳检测 ODN 的质量。也可用微型胶（5 ml）进行快速检测。

(1) 制备 5 ml 12%变性丙烯酰胺凝胶。

(2) 低热搅拌溶液直到所有组分完全溶解。

(3) 溶液在冷水浴中搅拌冷却至室温。

(4) 加入 21.4 μl 25%过硫酸铵和 7.2 μl TEMED。

(5) 搅拌并注入微型胶膜具。待胶凝固，大约 1 h。

(6) 对将要试验的 ODN 的浓度进行检测，制备 20 ng/μl 储备液。

(7) 取 5 μl 样本，并和 5 μl 甲酰胺上样染料结合。

(8) 95℃加热样本 5 min，冰上快速冷却至少 2 min。

(9) 上样之前洗孔，除去多余的丙烯酰胺。

(10) 首先上样 10 bp 的梯度 DNA，然后上样样本。

(11) 200 V 电泳直至溴苯酚染料溢出凝胶，大约需要 1.5 h。

(12) 溴化乙锭溶液染色 5 min，并拍照。

3.3.2 ODN 转染原代人角质形成细胞

(1) 转染前一天，分离细胞（见 3.1.2），将细胞接种到 12 孔板，1 ml/孔，细胞密度为 1.0×10^5 个细胞/孔（也可使用 24 孔板和 6 孔板）。为了进行有效的转染，细胞达到 70%融合是非常重要的。

(2) 加入 2～3 μg ODN 到 Opti-MEM I 培养基，足以制成总体积 100 μl，放置备用。

(3) 另一管中加入 6 μl 的 FuGENE6 试剂于 Opti-MEM I 培养基，终体积为100 μl。直接加入 FuGENE6 试剂于培养基，不要接触管壁。DNA 与 FuGENE6 的比例不超过 2∶3 (μg∶μl)，这一点很重要。

(4) 将稀释的脂质体溶液逐滴加到 ODN 溶液，轻柔混匀，室温静置 15 min。

(5) 细胞培养过程中，用 1 ml 新鲜培养基换液。

(6) 把 FuGENE6-ODN 复合物全部逐滴加至细胞培养板。从培养板的中间开始加入混合液，以螺旋的方式向外移动。左右前后晃动培养板，均匀地分散混合液。

(7) 6 h 后，从已转染的细胞中吸出培养液，重新加入 1 ml 新鲜培养基。FuGENE6 对角质形成细胞无毒性，因此，它可与细胞保持 24 h。

(8) 48 h 后，细胞即可以用于基因校正的检测（见 3.4）。

3.3.3 原代人角质形成细胞中 ODN 的摄取

(1) 感染前一天，如 3.1.2 所述用胰蛋白酶消化角质形成细胞，接种于放置在 6 孔板中的火焰灭菌的盖玻片上。

(2) 为了方便观察 ODN 摄取，合成 ODN 时其 5′端已掺入荧光基团（荧光素、Cy5、Cy3 或亚磷酰胺罗丹明衍生物）。给细胞转染适量的荧光 ODN 和脂质体（见 3.3.2）。

(3) 37℃孵育 3～6 h。确保孵育过程中溶液完全覆盖盖玻片。

(4) 1× DPBS 洗盖玻片两次，一次用酸性洗液，一次用 1× DPBS。

(5) 用 1× DPBS 配制的 1%戊二醛溶液固定细胞，4℃ 5 min，或者用 3.7%多聚甲醛溶液室温固定 20 min。

(6) 吸去固定液，用 1× DPBS 洗盖玻片两次。

(7) 将盖玻片从培养板中取出，干燥。

(8) 加一滴 Vectashield 封固剂于载玻片中央。

(9) 将盖玻片放在载玻片上，细胞应在两者之间，并确认没有气泡。

(10) 用指甲油封闭盖玻片边缘，并任其干燥。

(11) 载玻片可在荧光显微镜下观察，也可－20℃保存载玻片。

3.4 打靶事件的鉴定

3.4.1 已打靶角质形成细胞 β-半乳糖苷酶活性的组织化学染色

下面的操作步骤用来检测角质形成细胞中 ODN 介导的基因校正，即通过逆转录感染使得突变的 *LacZ* 整合到这些细胞的染色体（见 3.2）。当 ODN 校正角质形成细胞中突变的 *LacZ* 时，突变 β-半乳糖苷酶的活性就得以恢复，可用 X-gal 染色检测已被修复

的细胞。如果所用基因为突变的药物抗性基因（$puro^S$ 或 neo^S），那么用相应的抗生素培养基筛选出的存活细胞克隆总数可以代表打靶成功的细胞个数。

（1）当细胞已准备好可用于分析时，从培养箱中取出培养板，吸去培养基并用 1× DPBS 洗三次。

（2）缓慢加入 1 ml 固定液（1× DPBS 配制的 1%戊二醛），4℃孵育 5 min。

（3）吸去固定液，1× DPBS 1 ml 室温下洗三次。

（4）根据培养板的大小，加 1 ml（12 孔板）或 2 ml（6 孔板）染液。

（5）于 37℃细菌培养箱培养过夜。

（6）蒸馏水冲洗培养板数次。

（7）最后一次漂洗后，在细胞上剩余足量的水，光学显微镜下观察。基因校正的细胞染成蓝色。

3.4.2 用 PCR-RFLP 分析基因组 DNA

若将突变药物抗性基因（$puro^S$或 neo^S）用于打靶，则存活的克隆（$puro^r$或 neo^r）可被含相应的抗生素培养基所选择。每一克隆必须用克隆柱分别挑取，从这些克隆中分离出基因组 DNA，采用 PCR-RFLP、Southern 印迹和 DNA 测序证实基因修复。

（1）参照 3.2.3.1 列出的步骤（1）～（19），从克隆细胞系中分离出基因组 DNA。

（2）按如下步骤作 PCR 准备：基因组 DNA 溶解液（1～5 μl），10× PCR 缓冲液（5 μl），dNTPs 混合物（1 μl），10 μmol/L 引物 1 和引物 2（每个 1 μl），AmpliTaq Gold 聚合酶（0.25 μl），用蒸馏水补足至 50 μl。为了提高检测的灵敏性，也可以对 PCR 产物进行放射性标记，PCR 反应混合液加入 1 μl [α-^{32}P] dCTP（3000 Ci/mmol）即可。

（3）利用适当的循环数进行 PCR。

（4）扩增结束后，取 8 μl PCR 产物在 10 μl 总体积中用适当的限制酶酶切消化。

（5）适合温度下进行 3～5 h 酶切反应。

（6）准备一微型丙烯酰胺凝胶（5 ml），酶切样本全部上样进行电泳，未酶切的样本作为对照。

（7）溴化乙锭染胶并拍照。

（8）如果使用放射性 PCR，将 1～2 μl 放射性标记产物转移至闪烁瓶，并用闪烁计数器计数放射性。

（9）通常 1 μl PCR 混合物足够进行限制性酶切。

（10）准备一微型丙烯酰胺凝胶并如前进行酶切样本电泳，每孔上样 2～5 μl。

（11）用 30%甲醇/7%乙酸溶液固定胶，室温 20 min。

（12）干胶器中干燥丙烯酰胺凝胶（50℃，3～5 h），并在 X 射线片上曝光大约 10 min。

4 注意事项

（1）如果想要重新标记，不要让 Zeta-Probe GT 膜在两次杂交之间变干燥。在大容量含 0.1× SSC/0.5% SDS 的溶液中放射性自显影 95℃ 30 min 之后，应尽快剥离膜。

（2）为了检测β-半乳糖苷酶，我们推荐Promega的β-半乳糖苷酶单克隆抗体（1∶5000）及碱性磷酸酶标记的抗小鼠的二抗（1∶7500）。

（3）孵育的条件很重要，孵育太久会产生非特异结合。室温孵育1 h已足够。

（金　旻译　陈　林校）

参 考 文 献

[1] Fuchs, E., Merrill, B.J., Jamora, C., and Das Gupta, R. (2001) At the roots of a never-ending cycle. *Dev. Cell* **1**, 3—25.

[2] Gallico, G., O'Connor, N.E., Compton, C.C., Kehinde, O., and Green, H. (1984) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* **311**, 448—451.

[3] Watt, F.M. (2000) Epidermal stem cells as targets for gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 11, 2261—2266.

[4] Lavker, R.M. and Sun, T.T. (2000) Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13, 473—13, 475.

[5] Morgan, J.R., Barrandon, Y., Green, H., and Mulligan, R.C. (1987) Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science* **237**, 1476—1479.

[6] Mulligan, R.C. (1993) The basic science of gene therapy. *Science* **260**, 926—932.

[7] Miller, D.G., Adam, M.H., and Miller, A.D. (1990) Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4239—4242.

[8] Miller, A.D. (1990) Retrovirus packaging cells. *Hum. Gene Ther.* **1**, 5—11.

[9] Palmer, T.D., Roseman, G.J., Osborne, W.R.A., and Miller, A.D. (1991) Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1330—1334.

[10] Temin, H.M. (1990) Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **1**, 111—123.

[11] Donahue, R.E., Kessler, S.W., Bodine, D., McKonaugh, K., Dunbar, C., Goodman, S., et al. (1992) Helper virus induced T cell lymphoma in non-human primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* **176**, 1125- 1135.

[12] Kozarsky, K.F. and Wilson, J.M. (1993) Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr. Opin. Gene Dev.* **3**, 499—503.

[13] Capecchi, M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288- 1292.

[14] Wang, G., Seidman, M.M., and Glazer, P.M. (1996). Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* **271**, 802—805.

[15] Goncz, K.K., Kunzelmann, K., Xu, Z., and Gruenert, D.C. (1998) Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1913—1919.

[16] Culver, K.W., Hsieh, W.T., Huyen, Y., Chen, V., Liu, J., Khripine, Y., et al. (1999) Correction of chromosomal point mutations in human cells with bifunctional oligonucleotides. *Nat. Biotech-nol.* **17**, 989 —993.

[17] Russell, D.W. and Hirata, R.K. (1998) Human gene targeting by viral vectors. *Nat. Genet.* **18**, 325 -330.

[18] Igoucheva, O., Alexeev, V., and Yoon, K. (2001) Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene Ther.* **8**, 391—399.

[19] Yoon, K., Igoucheva, O., and Alexeev, V. (2002) Expectations and reality in gene repair. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1197—1198.

[20] Alexeev, V., Igoucheva, O., and Yoon, K. (2002) Simultaneous targeted alteration of the tyrosinase and c-

kit genes by single-stranded oligonucleotides. *Gene Ther.* **9**, 1667—1675.

[21] Pierce, E. A., Liu, Q., Igoucheva, O., Omarrudin, R., Ma, H. C., Diamond, S., et al. (2002) Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther.* **10**, 24—33.

[22] Felgner, P. L. and Ringold, G. M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* (London) **337**, 387—388.

[23] Nestle, F. O., Mitra, R. S., Bennett, C. F., Chan, H., and Nickoloff, B. J. (1994) Cationic lipid is not required for uptake and selective inhibitory activity of ICAM-1 phosphorothioate antisense oligonucleotides in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 569—575.

[24] Santana, E., Peritz, A. E., Iyer, S., Uitto, J., and Yon, K. (1998) Different frequency of gene targeting events by the RNA-DNA oligonucleotide among epithelial cells. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 1172—1177.

[25] Mirmohammadsadegh, A., Maschke, J., Basner-Tschakarjan, E., Bar, A., and Hengge, U. R. (2002) Reaction of keratinocytes to exogenous DNA. *Cells Tissues Organs* **172**, 86—95.

[26] van der Steege G., Schuilenga-Hut, P. H., Buys, C. H., Scheffer, H., Pas, H. H., and Jonkman, M. F. (2001) Persistent failures in gene repair. *Nat. Biotechnol.* **19**, 305—306.

[27] Igoucheva, O., Peritz, A. E., Levy, D., and Yoon, K. (1999) A sequence-specific gene correction by an RNA-DNA oligonucleotide in mammalian cells characterized by transfection and nuclear extract using a lacZ shuttle system. *Gene Ther.* **6**, 1960—1971.

[28] Yoon, K. and Alexeev, V. (2000) Retroviral delivery of EMC genes to cells. *Methods Mol. Med.* **139**, 197—208.

第31章　人SPRR基因家族启动子分析

David F. Fischer，Claude Backendorf

摘　要：本章提供一个研究保守的多基因家族（SPRR基因）在培养人正常角质形成细胞（NHK）的钙诱导分化过程中调节作用的实验步骤。启动子报告基因载体的转染联合启动子的截短可以用以研究特定SPRR基因的表达，并明确特异的转录因子的结合位点。调节因子与这些调控元件的相互作用可以通过电泳迁移率变动分析（EMSA）进行观察和定量。在这些实验中加入特异性抗体可以鉴定参与出现泳动率变动（超移动）的相关转录因子。本文也描述了竞争性EMSA实验，它非常适合于研究不同SPRR成员的不同调节。这些方法对研究角质形成细胞终末分化过程中其他多基因家族的调节也适用。

关键词：SPRR基因家族；氯霉素转乙酰基酶（CAT）；萤光素酶；竞争EMSA；超滞留实验；分化调节；启动子调节元件；角质形成细胞；终末分化；表皮屏障适应

1　导言

在角质形成细胞终末分化晚期合成的角质化细胞包膜（cornified cell envelope，CE）是复层鳞状上皮提供给机体的保护性屏障中的主要决定成分。构成CE的结构蛋白包括外皮蛋白（involucrin）、兜甲蛋白（loricrin）、后期包膜前体（late envelope precursors，LEP），以及小富含脯氨酸蛋白（small proline-rich proteins，SPRR）。这些蛋白质均由位于人类1q21染色体上的基因编码[1,2]。SPRR由11个独立的成员组成一个基因家族。尽管这些蛋白质高度保守，但相应的基因在不同的上皮，其调节有很大差异，并对不同的生理和环境因素刺激产生反应。研究表明，SPRR的蛋白质含量对调节鳞状上皮的生物力学特性、建立适应性屏障功能十分重要，这些功能始终同外界环境的变化保持平衡[3]。本章节提供的操作步骤尤其适用于研究多基因大家族的高度保守成员的不同调节。

2　材料

2.1　正常人角质形成细胞的培养

原代人角质形成细胞和角质形成细胞无血清培养基可从Gibco™购买（Invitrogen Corporation，San Diego，CA）：

（1）原代人角质形成细胞（Gibco.：cat. no. 12332-011）。

（2）角质形成细胞专用无血清培养基（KSFM）（Gibco.；cat. no. 10744-019），可在4℃保存3个月。

（3）DMEM（Gibco.；cat. no. 12800），可在4℃ 保存6个月。

（4）小牛血清（精制/含铁）（Hyclone，Logan，UT；cat. no. SH30072.03），可在－20℃保存数年。

（5）HiCal 培养基：DMEM＋8% 小牛血清，可在4℃保存3周。

2.2 质粒的准备

Qiagen 质粒小量抽提试剂盒（Qiagen N.V.，Venlo，The Netherlands；cat. no. 121143）。

2.3 报告基因质粒的转染

（1）CAT 基础载体：pBA-cat，pBLcat5（由莱顿大学的 C. Backendorf 提供）。

（2）萤光素酶基础载体：pGL3-基础载体（Promega，Madison，WI；cat. no. E1751）。

（3）SPRR-报告基因融合质粒[7~9]（由莱顿大学的 C. Backendorf 提供）。

（4）有盖的聚苯乙烯管（Greiner Bio-One Inc.，Longwood，FL；cat. no. 155180）。

（5）DMEM（无钙）（Gibco.；cat. no. 21068），可在4℃保存6个月。

（6）DOTAP 脂质体转染试剂（Roche Applied Science，Basel，Switzerland；cat. no. 1811177），可在4℃保存一年。

（7）PBS（Gibco.；cat. no. 14190），可室温保存一年。

2.4 CAT 测定

（1）20× TBS：500 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4；2.74 mol/L NaCl，100 mmol/L KCl，14 mmol/L $CaCl_2$，10 mmol/L $MgCl_2$，可室温保存1个月。

（2）0.25 mol/L Tris-HCl，pH 7.8。可4℃保存数月。

（3）CAT 测定缓冲液：400 mmol/L Tris-HCl，pH 7.8；100 mmol/L KCl，24 mmol/L $MgCl_2$，可在－20℃保存一年。

（4）5 mmol/L 辅酶 A（溶于 0.25 mmol/L Tris-HCl，pH 7.8）（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO；cat. no. C3144）。分装后可在－80℃保存一年。

（5）100 mmol/L ATP（Roche Applied Science；cat. no. 519979），溶于 0.1 mol/L Tris 碱中，分装，－20℃保存至少一年。

（6）100 mg/ml 氯霉素（Sigma；cat. no. C0378）（乙醇溶解），可在－20℃保存数年。

（7）^3H 标记的乙酸钠（5 mCi/ml）（ICN Radiochemicals，Irvine，CA；cat. no. 012200405）。乙醇稀释10倍后使用，可在4℃保存一年。

（8）*S*-乙酰辅酶 A 合成酶（2.5 mg/ml；Sigma；cat. no. A1763），－20℃保存一年。

（9）Econofluor-2 闪烁液（Perkin Elmer Life Science，Boston，MA；cat. no. 6NE9699）。

2.5 萤光素酶活性测定

（1）5× 萤光素酶溶解液（Promega；cat. no. E1531）：125 mmol/L Tris-HCl，pH

7.8；10 mmol/L DTT，10 mmol/L 环己烷二胺四乙酸（CDTA），50% 甘油，5% Triton X-100（−20℃ 保存 1 年）。

（2）CDTA（Sigma；cat. no. D0922）。可室温保存数年。

（3）萤光素酶活性测定试剂（Promega；cat. no. E1483）：20 mmol/L Tricine（两性离子缓冲剂），1.07 mmol/L $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$，2.67 mmol/L $MgSO_4$，0.1 mmol/L EDTA，33.3 mmol/L DTT，270 μmol/L 辅酶 A，470 μmol/L 萤光素（luciferin），530 μmol/L ATP。分装后−80℃储存一年。

（4）辅酶 A（Sigma；cat. no. C3144），−20℃ 保存一年。

（5）合成 D-萤光素（Sigma；cat. no. L9504），−20℃ 保存一年。

（6）重组萤火虫萤光素酶（Promega；cat. no. E1701 或 Sigma；cat. no. L9506），−20℃保存一年。

（7）Bio-Rad 蛋白质测定浓缩染色试剂（Biorad Laboratories Inc.，Hercules，CA；cat. no. 500-0006），4℃可保存数年。

2.6 核提取物

（1）缓冲液 A：10 mmol/L HEPES，pH 7.9；10 mmol/L KCl，0.1 mmol/L EDTA，0.1 mmol/L EGTA，1 mmol/L DTT，0.5 mmol/L PMSF。−20℃保存一年。

（2）缓冲液 C：20 mmol/L HEPES，pH 7.9；0.4 mol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，1 mmol/L EGTA，1 mmol/LDTT，1 mmol/L PMSF。

（3）NP-40（Sigma；cat. no. N6507），最近已被 Igepal Ca-630 取代（Sigma；cat. no. I 3021）。可室温下保存几年。

2.7 电泳迁移率变动分析（EMSA）

（1）10× 激酶缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；100 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L DTT。−20℃保存一年。

（2）尿素上样缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；1 mmol/L EDTA，6 mol/L 尿素，15% Ficoll 400，0.25% 溴酚蓝，0.25% 二甲苯苯胺 FF。室温保存一年。

（3）Ficoll 400（Sigma；cat. no. F4375）。室温保存。

（4）T4 多核苷酸激酶（10 U/μl，Invitrogen；cat. no. 18004）。−20℃保存一年。

（5）Redivue γ-^{32}P-ATP（10 mCi/ml，5000 Ci/mmol，Amersham Biosciences Corp.，Piscataway，NJ；cat. no. AA0018）。4℃ 保存 1 个月。

（6）Criterion™ TBE-尿素凝胶（15% 丙烯酰胺；Bio-Rad；cat. no. 345-0091）。室温保存数月。

（7）洗脱缓冲液：0.1 mol/L 乙酸钠，pH 8.0。4℃保存 6 个月。

（8）Eppendorf 微型小研杵（Eppendorf AG，Hamburg，Germany；cat. no. 022365622）。

（9）4.5 ml 锥形 PS 管（Greiner；cat. no. 116101）。

（10）十八烷基（C18）Zorbax LP 100/40 C18（Sigma；cat. no. S7421）。可室温保存数年。

（11）乙腈（J. T. Baker Chemicals B. V.，Phillipsburg，NJ；cat. no. 8004）。可室温保存数年。

（12）寡核苷酸退火缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；100 mmol/L KCl；1 mmol/L $MgCl_2$。－20℃保存一年。

（13）30％丙烯酰胺/N，N′亚甲双丙烯酰胺（Bio-Rad；cat. no. 161-0154），4℃可保存数月。

（14）5× TBE 缓冲液：0.45 mol/L Tris-硼酸盐，10 mmol/L EDTA。室温保存数月。

（15）5× TGE 缓冲液：125 mmol/L Tris，950 mmol/L 甘氨酸，5 mmol/L EDTA。室温保存数月。

（16）Poly（dI-dC）·poly（dI-dC）（Amersham；cat. no. 27-7880）储备液：1 μg/μl 溶于 10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；0.1 mmol/L EDTA，50 mmol/L NaCl，45℃加热 5 min。－20°保存一年。

2.8 超迁移（supershift）分析中使用的商品化抗体

所有抗体均购自 Santa Cruz 生物技术公司（Santa Cruz，CA）：

（1）c-Jun（N）（cat. no. sc-45）。

（2）JunB（N-17）（cat. no. sc-46）。

（3）JunD（329）（cat. no. sc-74）。

（4）c-Fos（4）（cat. no. sc-52）。

（5）FosB（102）（cat. no. sc-48）。

（6）Fra-1（R-20）（cat. no. sc-605）。

（7）Fra-2（Q-20）（cat. no. sc-604）。

（8）ATF-2（C-19）（cat. no. sc-187）。

3 方法

3.1 启动子报告基因融合质粒转染培养的人角质形成细胞

（1）根据 Gibco™的产品说明，用角质形成细胞专用无血清培养基在 6 cm 培养皿中培养原代人角质形成细胞达到融合。使用 Qiagen 公司质粒纯化试剂盒纯化启动子 CAT 或启动子萤光素酶报告基因质粒［见注意事项（1）］，获得高质量的 DNA 供后续转染实验使用。

（2）在无菌的 12 ml 聚苯乙烯管中配制下列溶液（以转染 6 cm 培养皿为例）［见注意事项（2）］：0.5 ml DMEM（无钙）及 5 μg 报告基因质粒。

（3）混合后逐滴加入 25 μl DOTAP 转染试剂。

（4）轻柔混匀（不要涡旋混匀），室温孵育 20 min。

（5）用 5 ml DMEM（无钙）漂洗角质形成细胞培养皿两次，每个培养皿加入 0.5 ml 该培养基。

（6）向每个培养皿中加入转染混合液（±0.5 ml），置湿化的 CO_2 孵箱孵育 2 h，

其间间断摇晃培养皿［见注意事项（3）］。

（7）弃去转染混合液，用 PBS 洗两次。

（8）加入 5 ml HiCal 培养基（钙浓度为 1.8 mmol/L），在 CO_2 孵箱内诱导角质形成细胞分化 24～48 h。

3.2 CAT 提取液的制备

（1）用冷的 TBS（1×）洗一次转染细胞，每培养皿加入 0.5 ml TBS。

（2）用橡皮刮将细胞刮下并移入离心管，4℃，3300 *g* 离心 5 min。

（3）弃上清，用 100 μl 0.25 mol/L Tris-HCl（pH 7.8）重悬细胞沉淀。

（4）将试管放置冰上，超声破碎（总能量 35 J），约 10 s［见注意事项（4）］。

（5）65℃孵育 10 min［见注意事项（5）］，室温下 16 000 *g* 离心 10 min。

（6）将上清转移至新的微量离心管中。

（7）测定蛋白质浓度[7~9]：用 95 μl 水稀释 5 μl 细胞溶解物，测定 230 nm 和 260 nm 处的 OD 值。溶解物中的蛋白质浓度可以通过下列公式计算：

$$c(\mu g/ml) = (187\ OD_{230} - 81.7\ OD_{260}) \times 20$$

（8）将细胞溶解物分装后储存在－20℃。避免反复冻融。

3.3 CAT 定量［见注意事项（6）］

（1）在微量离心管中配制下列标记混合物（供 20 个反应的量）：200 μl 水，125 μl CAT 测定缓冲液，40 μl 辅酶 A，15 μl ATP，10 μl 乙酸钠，7 μl 氯霉素，2 μl ^3H 标记的乙酸钠，5 μl *S*-乙酰辅酶 A 合成酶。

（2）37℃孵育 30 min。

（3）在闪烁瓶管内加入 5 μg 细胞溶解物，并用 0.25 mol/L Tris-HCl（pH 7.8）将总体积调节至 40 μl。

（4）加入 20 μl 预孵育过的标记混合物。反复吹吸数次，充分混匀。

（5）小心加入 1.5 ml Econofluor 闪烁液（不同液相之间不要混合）。

（6）使用闪烁计数器在 ^3H 通道过夜，计数放射性。每管在过夜测定中应该计数 15～20 次，每次 1 min，以得到良好的反应曲线。

（7）每个样本的 CAT 活性可以通过计算反应曲线线性范围内的斜率获得。

3.4 萤光素酶提取物的制备

（1）转染细胞用 PBS 洗两次。

（2）加入 500 μl 萤光素酶溶解缓冲液，室温孵育 1 min，用橡皮刮刮下细胞，用反复抽吸的方法将溶解物混匀并移至新微量离心管中。

（3）以总能量 35 J 的超声粉碎细胞［见注意事项（5）］，16 000 *g* 离心 5 min，收集上清。

（4）收集细胞溶解物后，立即测定萤光素酶活性［见 3.6；注意事项（7）］。采用 1∶5 稀释的 Bio-Rad 蛋白质浓度测定染色剂，用 Bradford 法测定蛋白质浓度[8]，在 595 nm 处读取吸光度值。

3.5 CAT-萤光素酶混合提取物

如果需要对同一提取物同时检测 CAT 和萤光素酶的活性［其中一个报告基因可以被当做内对照；也见注意事项（1）］，则可使用以下步骤：

（1）参照 CAT 样本收集方法（见 3.2），用 100 μl 0.25 mol/L Tris-HCl，pH 7.8 收集细胞；

（2）超声破碎后［35 J；见注意事项（5）］，将样本分装在两个离心管中；

（3）65℃孵育 CAT 样本 10 min［见注意事项（4）］，再按 3.2 的步骤继续处理；

（4）对萤光素酶样本需加入等体积的萤光素酶溶解缓冲液，反复吹吸，混合均匀，16 000 *g* 离心 5 min，收集上清［见注意事项（7）］。

3.6 萤光素酶定量

在 100 μl 萤光素酶检测试剂中加入 10 μl 溶解物（10～50 μg 总蛋白），混合，用发光测量计（如 Berthold Lumat luminometer）读取光发射。多次连续读取数据（每次间隔约 10 s），然后用平均值计算萤光素酶的活性。商品化的重组萤火虫萤光素酶可用来做标准。

3.7 核提取物的制备[9]

（1）取 10 cm 培养皿上融合生长的增殖或分化状态的角质形成细胞（见 3.1），用冰冷的 PBS（或 TBS）洗两次。

（2）向培养皿中加入 1 ml 冰冷的 PBS（或 TBS），用橡皮刮将细胞刮下并收集在离心管中。

（3）4℃，16 000 *g* 离心 15 s，弃上清，以下操作需在 4℃冷室中进行。

（4）向沉淀中加入 400 μl 冰冷的缓冲液 A，用黄色吸头轻轻吹打悬浮细胞。

（5）让细胞在冰上肿胀 15 min。

（6）加入 25 μl 10%（V/V）NP40，剧烈涡旋混匀 10 s，16 000 *g* 离心 20 s。上清可弃去，也可－20℃保存用于提取 RNA[9]。

（7）用 200 μl 缓冲液 A 洗沉淀一次，再悬浮于 100 μl 缓冲液 C。

（8）用微型管混匀器在 4℃剧烈振荡离心管 15 min。

（9）16 000 *g* 离心 5 min。

（10）将上清转移至新的离心管（不要吸入沉淀）中，10 μl 分装，－80℃保存。

（11）蛋白质浓度参照 3.2，通过分光光度计测定 OD_{230}/OD_{260} 值进行计算。

3.8 EMSA

3.8.1 放射性标记的双链 DNA 探针的制备［见注意事项（8）］

（1）合成的单链寡核苷酸含有特异性转录因子识别位点的共有序列（参照表 31.1），每侧至少有三个附加核苷酸的黏性末端，其 5′端用 T4 多核苷酸激酶和 γ-^{32}P-ATP 进行标记，并经过变性胶电泳、反相色谱法纯化，最后退火成未标记的互补链。

表 31.1 条带迁移实验中所用各种双链寡核苷酸的序列（仅显示一条链）

结合位点	基 因	序 列
POU	*SPRR2A*	5′GGATAAATTTGCATCTGGCT 3′
AP-1	*SPRR1A*	5′GTAGTGTGAGTCATGTGTG 3′
ATF	*SPRR3*	5′GCCCAGGTGACATCACTGTC 3′
KLF	*SPRR2A*	5′CCTGCTGGGTGGGGTAGCAGGCTCTA 3′
ETS	*SPRR1A*	5′CTTCTATTTCCTTGAGGC 3′
IRF	*SPRR2A*	5′GGGTAGTTTCACTTtCaGCTG 3′［见注意事项（14）］

注：共有序列用下划线表示，分别同下列转录因子家族的结合位点对应：POU，POU-结构域家族；AP-1，fos/jun 家族；ATF，Atf/Creb 家族；KLF，Krueppel 样因子家族；ETS，ets 转录因子；IRF，干扰素反应因子。

（2）配制下列标记混合物：5 μl H_2O，2 μl 寡核苷酸（1 pmol/μl），1.5 μl 10× 激酶缓冲液，6 μl γ-^{32}P-ATP，0.5 μl T4 多核苷酸激酶。

（3）37℃孵育 30 min，加入 5 μl 尿素上样缓冲液，在 15%TBE-尿素平板胶中进行电泳，直至溴酚蓝到达接近凝胶一半的位置。

（4）将凝胶用放射自显影胶片曝光（10～20 s），并将具有放射性的条带用手术刀切下移入离心管。

（5）用一次性微型小研杵（Eppendorf）小心将凝胶条带弄碎，并用 200 μl 洗脱缓冲液（0.1 mol/L 乙酸钠，pH 8）悬浮，60℃孵育过夜。

（6）用蓝色移液器吸头制备 C_{18}柱：将少量玻璃丝用巴氏吸管推入吸头，并在其上加入约 2 mm^3 C_{18}硅胶。将吸头放入适合的离心管（Greiner 公司的 4.5 ml 锥形 PS 管与大多数蓝色吸头都能相配），100 *g* 离心 1 min，将柱子用 200 μl 乙醇洗一次，用 200 μl 水洗两次。

（7）60℃孵育过夜后，将装有标记寡核苷酸的离心管 16 000 *g* 离心 10 min，将上清转入 C_{18}柱。向凝胶-条带沉淀中加入 100 μl 洗脱缓冲液，离心，将上清也转入 C_{18}柱。

（8）离心 C_{18}柱（1 min，100 *g*），弃滤出液，并用 200 μl H_2O 洗柱三次。

（9）用新鲜配制的 200 μl 25% 乙腈水溶液洗脱标记的寡核苷酸。

（10）在真空离心机（如 Speed-Vac，Savant）中蒸发乙腈；加入 100 μl H_2O，再次蒸发；用 100 μl 寡核苷酸退火缓冲液溶解标记的寡核苷酸。

（11）加入 4 pmol 未标记的互补链，将离心管在 90℃水浴中放置 1 min（确保管盖密闭），关掉加热装置，让其自然冷却至室温。

（12）将退火后的双链寡核苷酸−20℃保存（终浓度 20 fmol/μl）。

3.8.2 EMSA

（1）制备一个 200 mm×200 mm×1.5 mm 的平板凝胶，成分如下：4% 或 6% 丙烯酰胺/双丙烯酰胺（表 31.2），2% 甘油［见注意事项（9）］，0.25× TBE（或 1× TGE）（表 31.2），0.1%（*m*/*V*）过硫酸铵，0.1%（*m*/*V*）TEMED。

表 31.2 SPRR 基因调节研究中各种转录因子的优化结合缓冲液组成

	POU	AP-1	ATF	KLF	ETS	IRF	PROX
Tris-HCl，pH 6.8						20 mmol/L	
HEPES-KOH，pH 7.9	10 mmol/L	10 mmol/L	10 mmol/L	5 mmol/L	20 mmol/L		10 mmol/L
NaCl				25 mmol/L		50 mmol/L	50 mmol/L
KCl	60 mmol/L	60 mmol/L	60 mmol/L		50 mmol/L		
Ficoll-400	4%	4%	4%		3%		
甘油				10%	20%	20%	10%
EDTA	0.5 mmol/L	0.5 mmol/L	0.5 mmol/L	0.5 mmol/L	0.2 mmol/L	0.2 mmol/L	0.5 mmol/L
$MgCl_2$			5 mmol/L				
$ZnCl_2$				0.5 mmol/L			0.5 mmol/L
DTT	1 mmol/L	1 mmol/L	1 mmol/L	1 mmol/L	2.5 mmol/L	1 mmol/L	1 mmol/L
p(dl-dC)·p(dl-dC)	2 μg	2 μg	2 μg	1 μg	1 μg	1 μg	1 μg
BSA						0.25 μg/μl	0.25 μg/μl
%丙烯酰胺/双丙烯酰胺	4%	4%	4%	4%	4%	6%	4%
凝胶/电泳缓冲液	0.25× TBE	0.25× TBE	1× TGE	1× TGE	1× TGE	1× TGE	1× TGE

注：POU，POU 结构域家族；AP-1，fos/jun 家族；ATF，Atf/Creb 家族；KLF，Krueppel 样因子家族；ETS，ets 转录因子；IRF，干扰素反应因子。

PROX 表示用近端启动子区做探针进行竞争 EMSA 实验时的条件（见图 31.1）。

（2）室温聚合 30 min，将凝胶装入水平电泳装置，用 0.25× TBE（或 1× TGE；见表 31.2）作为电泳缓冲液。

（3）用前，在 200 V 下预跑凝胶至少 30 min（配备缓冲液循环）。

（4）制备下列结合混合物（终体积 20 μl）：10 μl 2× 结合缓冲液（表 31.2）；2 μl poly（dI-dC）·poly（dI-dC）（1 μg/μl）；10 μg 核提取物；加水至终体积 19 μl。

（5）室温下预孵育 5 min [见注意事项（10），见 3.8.3 和 3.8.4]。

（6）加入 1 μl（20 fmol）标记的双链寡核苷酸。

（7）室温下孵育 30 min。

（8）用电泳缓冲液冲洗预制平板胶的加样孔，加入孵育的混合液 [见注意事项（11）]。

（9）在室温下，200 V 电泳 1.5 h [配备缓冲液循环；见注意事项（12）]。

（10）移去其中一块玻璃板，小心将一张 Whatman 3MM 滤纸放在胶上，移去另一块玻璃板，真空凝胶干燥器上干胶。

（11）根据结合亲和力的不同，将干胶用 X 射线片曝光 1 h 或过夜。

3.8.3 超迁移（supershift）分析

为了明确导致凝胶上迁移率变动的转录因子，在加入标记探针前结合反应中应含有特异性抗体，先后在 4℃孵育 2 h 及室温孵育 5 min。然后加入标记寡核苷酸，结合反应在室温下进行 30 min（如 3.8.2 所述）。抗体同反式作用子/DNA 复合物的结合较单与转录因子的结合可造成迁移率更大的偏移（超迁移）。为了获得好的超迁移效果，关键是抗体不干扰复合物的形成。相反，用特异性抗体阻止复合物的形成可提示某个转录因子的存在，至少在使用同一个抗体时另一个不相关的复合物不会受影响。在 2.8 节，

我们提出了在 SPRR EMSA 实验中使用的一些商品化抗体（Santa Cruz Biotechnology)[4]。

3.8.4 竞争的启动子 EMSA

该技术是我们新近开展的，尤其适用于在一个基因家族内各基因间相互比较转录因子的结合情况。如图 31.1 中演示的，将与 *SPRR1A* 近端启动子区域（紧邻 TATA 盒上游）相对应的一个 40 碱基序列进行标记，作为 EMSA 中的放射性探针。竞争实验是在加入标记探针前的 5 min 预孵育阶段（见 3.8.2 节），在反应体系中加入 100 倍摩尔

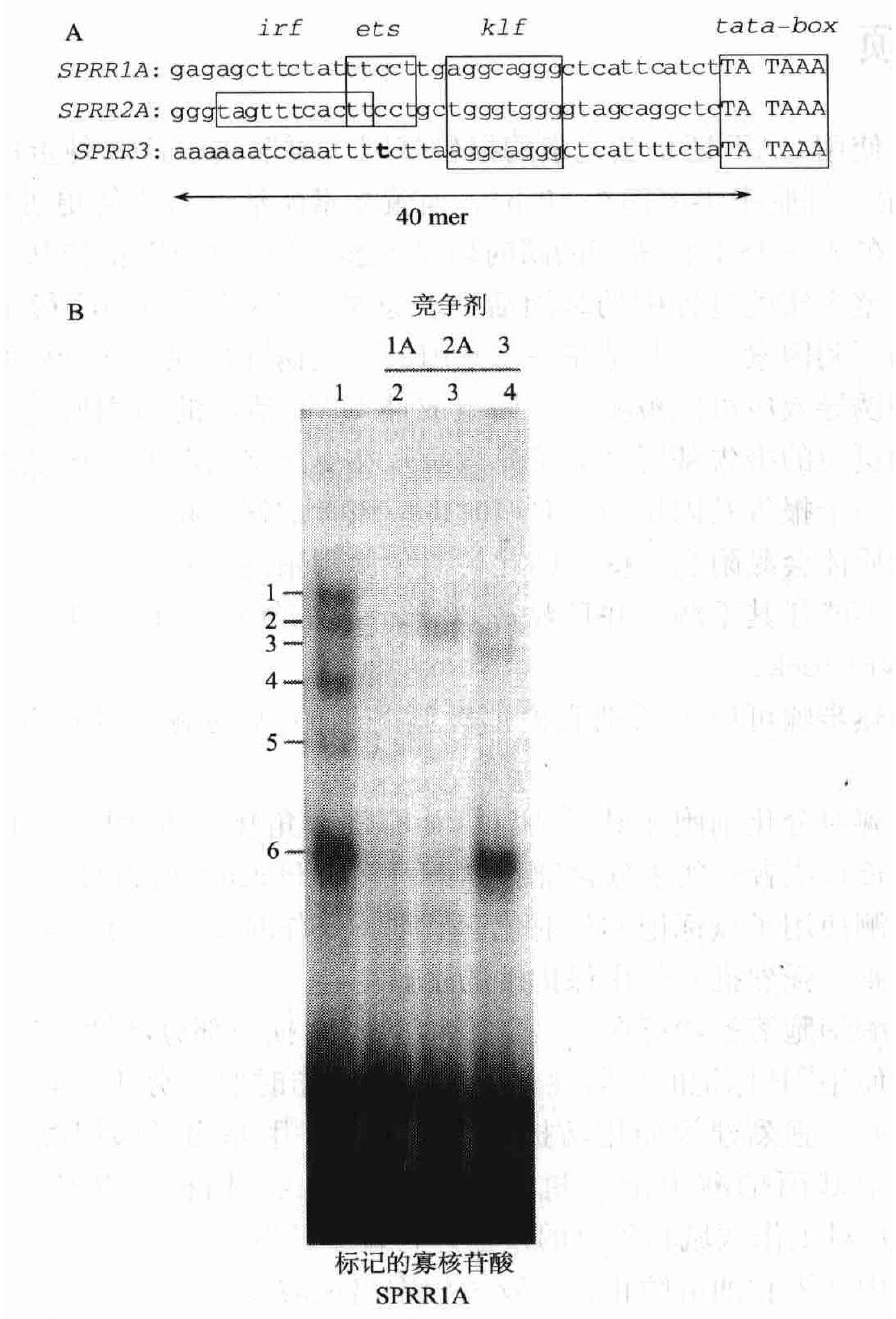


图 31.1 用涵盖 *SPRR1A*、*SPRR2A*、*SPRR3* 近端区域的 40 个碱基的寡核苷酸进行竞争性 EMSA
A. 实验中所用三个寡核苷酸的序列、TATA 盒的位置，以及 Irf、Ets 和 KLF 的结合位点均已标示。粗体字表示导致 Ets 位点消失的 *SPRR3* 突变。B. 迁移率变动分析参照 3.8.2 节使用 4%聚丙烯酰胺凝胶。对 *SPRR1A* 探针进行了标记，竞争实验使用 100 倍摩尔量的过量未标记片段，这些片段与 *SPRR2A* 或 *SPRR3* 基因相同启动子区域的序列相对应。

量的过量未标记*SPRR*1*A*片段（自我竞争），或相关*SPRR*2*A*和*SPRR*3基因中同一启动子区对应片段。该实验中结合缓冲液的组成见表31.2（PROX栏）。在泳道1（无竞争）观察到的各种*SPRR*1*A*复合物（条带1～6）是特异性的，因为它们均被过量未标记的*SPRR*1*A*探针（泳道2）所竞争。然而，复合物2不被*SPRR*2*A*片段竞争，复合物3和6不能被*SPRR*3片段竞争，不能被竞争提示这些结合位点在竞争性寡核苷酸序列中不存在。复合物3和6同Ets结合位点相对应［见注意事项（13)］，且之前我们已明确显示*SPRR*3不含有Ets近端结合位点[5]。复合物1、4和5同Klf结合位点对应，可在每个启动子中找到，也确实可被*SPRR*2*A*和*SPRR*3启动子片段竞争。

4 注意事项

（1）到底是使用CAT还是萤光素酶报告基因主要取决于这两种蛋白质的不同半衰期：CAT很稳定（细胞中半率期约50 h)，而萤光素酶活性对降解更敏感（半衰期2～3 h)。对于一般在24～48 h内进行的瞬时转染实验，使用CAT报告基因获得的数值是累积量，代表在整个实验过程中的基因活性的总量。CAT蛋白的高稳定性也是基因诱导调节研究中的不利因素，尤其是在一个基因的有效诱导出现在接受刺激因素后相对较晚的时间，这种诱导效应可能被实验早期组成性CAT活性的累积所掩盖。在这种情况下，使用半衰期更短的报告基因（如萤光素酶）在更严格的时间窗内观察基因活性则更理想。在将其中一个报告基因作为内对照时也应该考虑这一特点。

（2）由于脂质体会黏附在管壁，因此要避免使用聚丙烯管。

（3）培养皿不能任其干涸，并且要每20 min左右摇动一下。也可使用自动的培养皿摇动装置（Gyro-rocker)。

（4）这一加热步骤可以灭活细胞内消耗脂酰辅酶A的酶，但并不会影响CAT的活性。

（5）超声步骤对分化细胞尤其必要（因为有部分角化)。使用增殖的角质形成细胞（在KSFM中生长）或者一些未分化细胞如HeLa或HaCaT细胞时，该步可省略。

（6）该项检测使用了氚标记的放射化学试剂。操作时要十分小心，并遵守放射性保护建议的相关规则。强烈推荐使用保护性的手套。

（7）萤光素酶细胞溶解物可在 −80℃储存，但会损失部分活性。

（8）研究中使用^{32}P标记的放射性化学物质。操作时要十分小心，并遵守放射性保护建议的相关规则。强烈建议使用防护性手套、聚2-甲基丙烯酸甲酯的不碎透明塑料（Perspex）或聚甲基丙烯酸甲酯有机玻璃（Plexiglas）挡板，以及使用盖革计数器（Geiger counter）对工作区域和用过的仪器进行持续监测。

（9）在凝胶中加入甘油可防止在干胶过程中出现破裂。

（10）为验证相互作用的特异性，具有相同、突变或无关序列的未标记的双链寡核苷酸可以在孵育前的步骤中使用。这些寡核苷酸应该以超出标记寡核苷酸2～100倍不同摩尔浓度的量加入。从这些数据中可以了解相互作用的本质（如在结合位点中哪些核苷酸是重要的）和转录因子与给定结合位点间的亲和力[4～6]。

（11）将结合缓冲液中的样本上样时没有使用染料标记。我们已观察到溴酚蓝和二

甲苯蓝这些染料均会影响凝胶的迁移。

(12) 当使用0.25× TBE作为凝胶/电泳缓冲液时，缓冲液循环非常重要，这样可以避免胶和缓冲液槽内pH的变化。

(13) 各种阻滞条带的识别可以通过使用表31.1中所列单一结合位点的竞争实验进行测定［见注意事项（10)］。

(14) 小写字母表示已突变的碱基，它们是用来破坏重叠的Ets结合位点[9]。

致　谢：作者衷心感谢现在和以前在分子遗传实验室（Leiden Institute of Chemistry）角质形成细胞小组工作的所有人员，他们为这些实验步骤的建立和测试作出了贡献。

（陈　建译　罗向东　校）

参考文献

[1] South, A. P., Cabral, A., Ives, J. H., James, C. H., Mirza, G., Marenholz, I., et al. (1999) Human epidermal differentiation complex in a single 2.5 Mbp long continuum of overlapping DNA cloned in bacteria integrating physical and transcript maps. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 910—908.

[2] Marshall, D., Hardman, M. J., Nield, K. M., and Byrne, C. (2001) Differentially expressed late constituents of the epidermal cornified envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13 031—13 036.

[3] Cabral, A., Voskamp, P., Cleton-Jansen, A. M., South, A., Nizetic, D., and Backendorf, C. (2001) Structural organization and regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function. *J. Biol. Chem.* **276**, 19 231—19 237.

[4] Sark, M. W., Fischer, D. F., de Meijer, E., van de Putte, P., and Backendorf, C. (1998) AP-1 and ets transcription factors regulate the expression of the human SPRR1A keratinocyte terminal differentiation marker. *J. Biol. Chem.* **273**, 24 683—24 692.

[5] Fischer, D. F., Sark, M. W., Lehtola, M. M., Gibbs, S., van de Putte, P., and Backendorf, C. (1999) Structure and evolution of the human *SPRR*3 gene: implications for function and regulation. *Genomics* **55**, 88—99.

[6] Fischer, D. F., Gibbs, S., van De Putte, P., and Backendorf, C. (1996) Interdependent transcription control elements regulate the expression of the SPRR2A gene during keratinocyte terminal differentiation. *Mol. Cell Biol.* **16**, 5365—5374.

[7] Kalb, V. F., Jr. and Bernlohr R. W. (1977) A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal. Biochem.* **82**, 362—371.

[8] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248—254.

[9] Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts," prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419.

第32章　大片段PAC重组载体在角质形成细胞中的稳定整合

Sarah H. Williams，Alain Hovnanian

摘　要：将P1衍生的人工染色体（P1-derived artificial chromosome，PAC）DNA转染角质形成细胞是一个非常重要的技术。该技术能用于角质形成细胞特异基因的功能研究，也有希望用于遗传性和获得性疾病的基因组基因治疗研究。皮肤是施予在体治疗的最容易接近的器官，采用已建立好的角质形成细胞培养及移植条件是有可能实现的活体外基因治疗的途径。PAC载体缺乏相应的报告基因来区分转染及未转染的哺乳动物细胞，或用于筛选PAC重组载体已稳定整合至基因组内的阳性克隆。本章将叙述改进报告基因盒的实验方案，以及将大片段PAC重组载体转染角质形成细胞而不需进行染色体断裂的技术。同时也将提及筛选稳定整合体和评定角质形成细胞基因组内整合情况的实验技术。
关键词：P1衍生的人工染色体（PAC）；基因组DNA转移；稳定整合；整合素靶向肽；角质形成细胞

1　导言

大片段DNA最初用于复杂基因组的物理作图研究，近来已广泛应用于功能基因的表达及递送基因组转基因的研究中。以基因组的方式进行基因转移具有许多优势，并能使转入基因稳定表达。已发现一些基于互补DNA（cDNA）设计的带有异源启动子的表达载体会出现转录沉默的现象，然而许多研究指出，采用包含侧翼区、基因内调节区和天然启动子的基因组位点能达到组织特异性、生理水平上的转染基因表达[1,2]。

酵母人工染色体是第一个发展起来的大片段DNA载体（large DNA vector），可携带2 Mb的DNA，但其高嵌合率、插入的不稳定性及难以制备，促使其他一些诸如P1衍生的人工染色体（P1-derived artificial chromosome，PAC）等替代体系得到发展。PAC以噬菌体P1的质粒复制子为基础，包含了阴性筛选标志*Sac*BII、卡那霉素抗性基因和一个*lox*P位点，可以携带多达300 kb的基因组DNA插入物而不造成明显的重排和嵌合[4]。用于真核细胞表达、基于大肠杆菌的大片段DNA-载体进行修饰的几种技术也得到发展[1,5]。本章详细介绍了高效率改造PAC的操作步骤，使它们能在哺乳动物细胞中筛选并实现对转染细胞的监测[6]；在与改良的插入片段连接之前，用*Not*I对PAC重组载体进行酶解使其线性化的步骤，该插入片段包含便于观察活的转染细胞的*EGFP*基因、分别用于哺乳动物细胞和细菌的抗生素筛选的嘌呤霉素及氨卞青霉素抗性基因。

基因组基因治疗或功能基因组面临的一个挑战就是如何输送目的基因。大多数使用

病毒的方法由于容量的限制，包装的DNA最大约为8 kb。病毒，甚至将大多数病毒编码序列去除之后的被称为高容量或低活性（gutless）的病毒仍具有较高的免疫原性。非病毒的转运方法虽然避免了这些问题，但转染效率常较低。本章介绍了包含$\alpha_5\beta_1$整合素靶向肽与脂质体（lipofectin）的转染混合物的配制方法[7]，以及将它用于传递PAC DNA给角质形成细胞的实验方法。受体介导内吞作用为许多细胞内病原体所采用，这些混合物利用了受体介导内吞作用中的整合素介导内在化信号通路，使大PAC重组载体（large PAC construct）能相对高效地转入角质形成细胞[8]。

转入后大片段DNA的维持是转基因稳定表达的关键，通过片段的稳定整合或作为稳定的附加体（也称游离基因）的持续存在来实现。在后一种情况下，许多研究报道了附加体的重排及在缺少压力筛选下每代细胞可能丢失2%～10%的附加体[9,10]。相反，PAC重组载体在整合到细胞基因组后，即使不使用压力筛选也可以维持表达。为了便于鉴定、分离和扩增稳定转染的克隆，本章介绍了可用于筛选转染角质形成细胞的实验方法。同时本文也补充介绍了定量Southern印迹和荧光原位杂交（FISH）技术，可用来分析PAC的整合情况，如拷贝数、整合位点等。

2 材料

2.1 设备

（1）脉冲场凝胶电泳装置（CHEF mapper pulsed field，Bio-Rad，Hemel Hempstead，UK，CHEF-DR III chiller system；cat. no. 170-3702）。

（2）电穿孔仪（Gene Pulser II electroporator，Bio-Rad；cat. no. 165-2106）。

（3）磷光成像盒和扫描仪（Phosphorimager cassette and scanner，Molecular Dynamics，Chesham，UK）。

（4）倒置荧光显微镜，如Nikon Diaphot 300。

（5）激光扫描共聚焦显微镜，如Bio-Rad MRC 1024。

2.2 PAC的修饰

（1）质粒提取试剂盒（Midiprep kit Tip-100，Qiagen，Crawley，UK；cat. no. 10043）。

（2）2× YT培养基：16 g细菌用胰蛋白胨，10 g细菌用酵母提取物，5 g NaCl，加水至1 L。

（3）肉汤培养基：12 g细菌用胰蛋白胨，24 g细菌用酵母提取物，4 ml甘油，100 ml KPB（17 mmol/L KH_2PO_4，72 mmol/L K_2HPO_4），加水至1 L。

（4）碱性SDS：0.2 mol/L NaOH，1% SDS；每次新鲜配制。

（5）7.5 mol/L乙酸铵（抽滤灭菌，室温保存）。

（6）pPBKG质粒[8]（图32.1；由alain.hovnanian@well.ox.ac.uk惠赠）。

（7）QIAquick凝胶提取试剂盒（Qiagen；cat. no. 28704）。

（8）Millipore V系列膜（0.025 μm孔径，Millipore，Watford，UK；cat. no. VSWP 01333）。

(9) 0.1 cm 电穿孔杯 (Bio-Rad; cat. no. 165-2089)。

(10) 电转感受态细菌 (Electro MAX DH10β electrocompetent cells, Gibco-BRL, Paisley, UK; cat. no. 18290-015, −80℃储存)。

(11) 引物 (5 pmol/μl):

PAC2 5′-CGCCGTACGTTTCTTTGTAT-3′

PAC4 5′-TGACTGGGTTGAAGGCTCTC-3′

AMP1 5′-TGCGCGTAATCTGCTGCTTG-3′

EGFP1 5′-TCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3′

2.3 角质形成细胞的培养

(1) 角质形成细胞，如 HaCaT 细胞[11]。

(2) 角质形成细胞培养基 (精制基础培养基，添加 L-谷氨酰胺、牛垂体提取物和表皮细胞生长因子，Gibco-BRL; cat. no. 17005-042。培养基于 4℃保存，添加物于 −20℃保存，充分混合后 4℃保存，并在 4 周内使用)。

(3) 胰蛋白酶/EDTA (Sigma, Poole, UK; cat. no. T3924)。

(4) 脂质体转染试剂 Lipofectin (Invitrogen, Paisley, UK; cat. no. 18292-011)。

(5) 150 mmol/L NaCl。

(6) OptiMem 培养基 (Gibco-BRL; cat. no. 31985-039, 4℃避光保存)。

(7) 整合素靶向肽[7] ($[K]_{16}$GACRRETAWACG)。冻干后−80℃保存备用。用前溶于 OptiMem 培养基，浓度为 0.1 mg/ml；装入打孔的 Parafilm 覆盖的锥形瓶中，4℃氧化过夜使其环化。一旦重悬，该肽在−80℃ 可稳定保存数年，−20℃可稳定保存至少 6 周。

(8) 嘌呤霉素溶液 (Sigma; cat. no. P8833) 浓度为 0.5～3 μg/ml，溶解于水中，抽滤灭菌，−20℃保存。可稳定保存 6 周。

(9) 克隆环 (将 200 μl 吸头在最宽处切去 0.8 cm，用前高温灭菌。同高温灭菌的凡士林一起使用)。

2.4 整合的分析

(1) 乙酰甲基秋水仙碱 (Colcemid) (Gibco-BRL; cat. no. 15210-040)。

(2) 75 mmol/L KCl。

(3) 甲醇：乙酸 (3∶1；每次新鲜配制)。

(4) Nick 翻译试剂盒 (Vysis, Richmond, UK; cat. no. 32-801-300)。

(5) Spectrum Red dUTP (Vysis; cat. no. 30-803-400, 4℃避光保存)。

(6) 生物素标记的 dUTP (Roche, Lewes, UK; cat. no. 1093070)。

(7) 大肠杆菌 tRNA (Roche; cat. no. 109541)。

(8) 超声处理的鲑鱼精 DNA (Sigma; cat. no. D-7656)。

(9) 50%甲酰胺，10%硫酸葡聚糖，2× SSC。

(10) 人 Cot-1 DNA (Gibco-BRL; cat. no. 15279-011)。

(11) 封闭液和抗体稀释液：1× PBS 配制的 5%脱脂奶粉，将 0.5 g 奶粉溶解在

10 ml 1× PBS-Tween 中，将 1.5 ml 离心管置 16 000 *g* 离心 20 min。在不碰到沉淀的情况下，移取表面的 1 ml 液体，用此作为封闭液和抗体的稀释液。在使用当天将抗体稀释到正确的倍数。避光保存在冰上备用。使用前，16 000 *g* 离心 1 min。注意使用抗体时不要碰到沉淀。

(12) FITC 结合的链亲和素 (Vector Labs, Peterborough, UK; cat. no. SA5001), 4℃避光保存。

(13) 生物素化的链亲和素 (Vector Labs; cat. no. BA-0500)。

(14) To-Pro-3 (Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands; cat. no. T-3605); 4℃避光保存。

(15) Yo-Pro-1 (Molecular Probes; cat. no. Y-3603), 4℃避光保存。

(16) Cy-3 结合的染色体染料 (Cambio, Cambridge, UK); 根据染色体不同选取相应的目录号，如 3 号染色体的染料，cat. no. 1153-303，4℃避光保存。

(17) Vectorshield 封固液 (Vector Labs; cat. no. H-1000)。

(18) 杂交缓冲液：50% 甲酰胺，4× SSC，50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.2)，1 mmol/L EDTA，8% 硫酸葡聚糖，1% SDS，200 mg/ml 降解鲑鱼精 DNA，10× Denhardt (每升中含 20 g Ficoll、20 g 牛血清白蛋白、20 g PVP-40)。

(19) Megaprime 标记试剂盒 (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK; cat. no. RPN1606)。

3 方法

3.1 PAC 的制备和改造

本章介绍微克级、可供转染的高纯度 PAC DNA 的制备，以及对含报告基因的基因表达盒进行改进使修饰后的 PAC 重组载体能用于稳定转染的实验。

3.1.1 PAC DNA 的大量制备

(1) 使用质粒提取试剂盒 Qiagen Tip-100 midi 的质粒纯化柱 (plasmid columns)，按照操作手册做一些修改。

(2) 把 5 ml 预培养的菌液接种于 400 ml 肉汤培养基。

(3) 将沉淀重悬于 40 ml P1 中充分混匀，37℃孵育 15 min。

(4) 向 P2、P3 溶液中加入 80 ml 新鲜配制的碱性 SDS，再加入 60 ml 乙酸铵，分别溶解和中和细菌。

(5) 溶解和中和细菌后先用灭菌纱布过滤上清，再重复离心步骤。此步可去除细菌碎片防止纯化柱被阻塞 [见注意事项 (1)]。

(6) 用加热至 70℃的 1 ml 5× 缓冲液 QF 洗脱 DNA。缓冲液加热后较室温下能洗脱更多的 DNA。

(7) 如果 DNA 要用于转染，可重悬于灭菌的 TE 10/1。

(8) 用切除尖端的吸头 [见注意事项 (2)] 吸取样本，在 20 μl 的反应体系中，用 10 U *Not*I [New England Biolabs (NEB), Hitchin, UK] 消化 2 μl PAC DNA，使插

入片段从 16 kb 载体上释放。

(9) 用 0.5× TBE 配制的 1% 脉冲场凝胶，在 6 V/cm、转换时间为 2～15 s 的条件下电泳 14 h。这样可使酶解片段分离，并评价制备 DNA 的质与量。DNA 的浓度仍需用分光光度计测量。

(10) 如需经常使用，将 DNA 保存于 4℃，也可在－20℃保存更长时间。

3.1.2 PAC 重组载体的改造[6]

3.1.2.1 制备基因表达盒

(1) 在 50 μl 反应体系中，用 50 U *Not*I 于 37℃下消化 10 μg pPBKG 质粒（图 32.1）3 h。

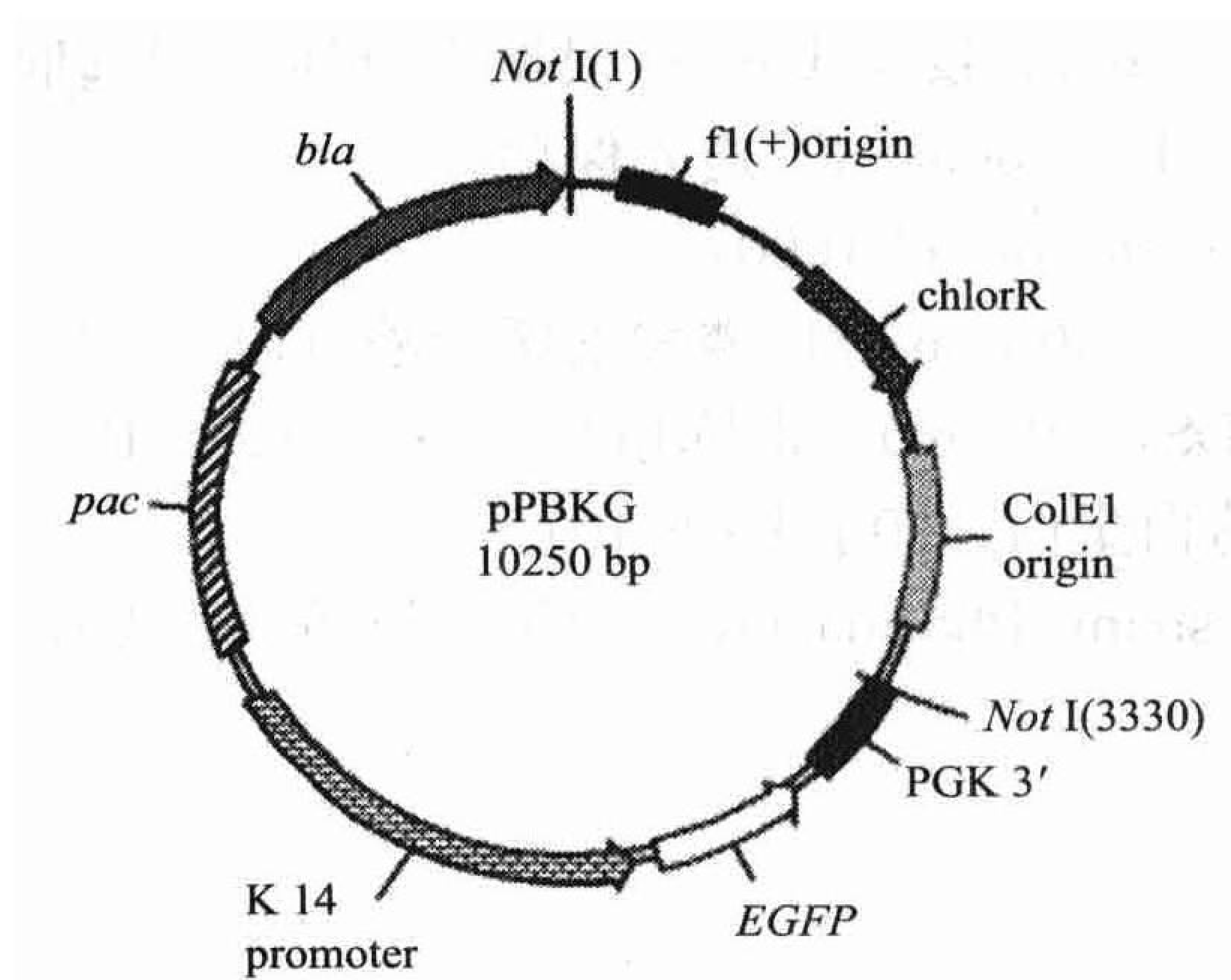


图 32.1 pPBKG 质粒

该质粒以 pBS KS 为骨架，包含受角蛋白 14（K14）启动子调控的 *EGFP* 基因，带有小鼠磷酸甘油酸激酶（PGK-1）3′UTR。细菌对氨苄青霉素的抗性由 β-内酰胺酶基因（*bla*）提供，哺乳动物细胞对嘌呤霉素的抗性由嘌呤霉素 *N*-乙酰基转移酶基因（*pac*）提供。

(2) 取 2 μl 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检查消化是否完全。

(3) 酶切产物于 65℃灭活 20 min，在 1× TAE 缓冲液中采用无溴化乙锭的 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离。

(4) 切下包含分子质量标准和 pPBKG 酶切小片段的凝胶条，用含 0.2 μg/ml 溴化乙锭的 TAE 缓冲液染色 20 min。

(5) 在紫外透射下确定 6.9 kb 片段在已染色凝胶上的位置，做切口标记。根据该标记切下未染色凝胶相应部位的条带（不要将该条带暴露于紫外光下）。

(6) 用 Qiagen QIAquick 凝胶提取试剂盒根据操作手册对凝胶进行回收纯化。

(7) 纯化的片段可于－20℃保存两周。

3.1.2.2 PAC 的部分酶解

(1) 为了在其中一个 *Not*I 位点切开 PAC 使其线性化，标记 12 个 Eppendorf 管为 1～12 号，用切去尖端的吸头来吸取 PAC DNA，配制下列两种主要混合液。

a. 39 μg PAC DNA
   52 μl 10× buffer 3（NEB）
   52 μl 10× BSA（NEB）
   加蒸馏水至 520 μl

b. 35 μl 10× buffer 3
   35 μl 10× BSA
   加蒸馏水至 350 μl

(2) 取 36.8 μl 混合液 b 放入 1 号管，20 μl 混合液 b 分别加至 2～12 号管。

(3) 在 1 号管中加入 3.2 μl *Not*I（10U/μl，NEB），充分混匀。

(4) 进行连续稀释：自 1 号管中取 20 μl 至 2 号管，混匀。然后自 2 号管中取 20 μl 至 3 号管，自 3 号管中取 20 μl 至 4 号管，依此类推。每次均使用新吸头并充分混匀。

(5) 将上述 Eppendorf 管放置于冰上直至第（7）步操作。

(6) 另取 12 个干净的 Eppendorf 管标记为 1～12 号，向每管中加入 40 μl 混合物 a。

(7) 取放置冰上的 1～12 号管中的酶混合物 10 μl 加至相对应的含 DNA 的 Eppendorf 管。消化的总容量为 50 μl，每管较前一管中每微克 DNA 的 *Not*I 含量下降一半：1 号管中含 2.67 U/μg DNA，2 号管中含 1.33 U/μg DNA，依此类推。

(8) 样品于 37℃ 孵育 2 h，65℃灭活 20 min。

(9) 取每组酶切产物各 10 μl 进行 1% 脉冲场凝胶电泳，条件为 6 V/cm，转换时间 2～15 s，电泳 14 h。这样可以判断酶切程度，用溴化乙锭染色以便照相。将剩余的 40 μl 酶切产物保存于 4℃。

(10) 将这 40 μl 主要包含线性化 PAC 分子（图 32.2）和少量空载体的酶切产物通过 Millipore V 膜进行液滴状透析来浓缩 DNA：膜的光面朝上，细心地将液滴滴在膜的中央，烧杯中加入 50～100 ml 5 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）和 0.5 mmol/L EDTA，透析膜漂浮于液体的表面，室温下 2 h。透析后将液滴吸出，4℃保存。

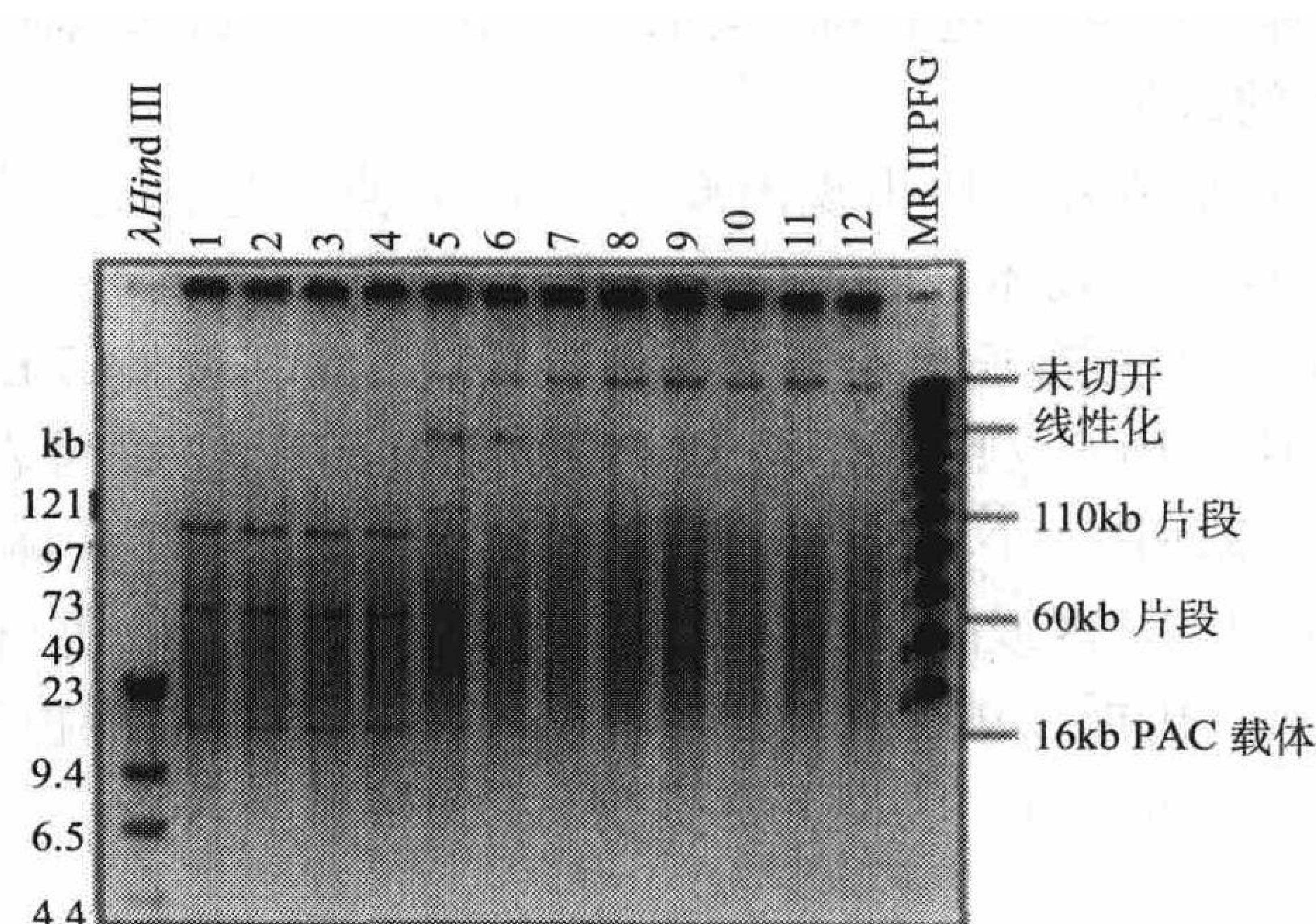


图 32.2 含 170kb 插入片段和带内部 *Not*I 位点的 PAC 重组载体经 *Not*I 部分酶解的 PFGE 分析

泳道 1～4 的样本完全酶解，可清晰地区分 16 kb 载体片段、110 kb 和 60 kb 的插入片段（由内部的 *Not*I 位点被酶切所获得）。当酶的浓度下降、酶解的位点减少，有更多的 DNA 被线性化（泳道 5～9）。最后的几个泳道显示没有被切开的 PAC DNA。包含线性化 DNA（泳道 5～9）且游离载体尽量少的样本可用于构建实验，以避免空载体产物的形成。

3.1.2.3 将基因表达盒与线性化 PAC 进行连接

(1) 对于每个选定的样本，用最多可达 0.6 μg 的 PAC DNA 制备下列反应体系：2 μl T4 DNA 连接酶缓冲液；1.5 μl T4 DNA 连接酶（400 U/μl；NEB）；纯化的改良后的基因表达盒与 PAC 载体的摩尔比为 1∶3；加水至 20 μl。

(2) 16℃孵育 16 h，然后 65℃热灭活连接酶 20 min。

(3) 在室温下将所有的连接产物对水进行微量透析 2 h。这样可降低样本中的盐浓度，避免在电穿孔杯中形成电弧。

(4) 将一管 ElectroMAX 电转感受态细菌 DH10β 置冰上，在开始解冻时加入已连接的 PAC/基因表达盒样本并轻弹管壁混匀。

(5) 移入电穿孔杯（0.1 cm），并用电转仪（Bio-Rad Gene Pulser）在 1.8 kV、200 Ω 和 25 μF 的条件下进行电穿孔。

(6) 立即加入 500 μl SOC 培养基，移入 Eppendorf 管，37℃孵育 1 h。

(7) 分别将 400 μl、40 μl、4 μl 培养液接种至含 30 μg/ml 卡那霉素和 50 μg/ml 氨苄青霉素的 2× YT 琼脂培养皿上。

(8) 挑选克隆，并用改良的碱裂解法制备小量质粒。

接种 5 ml 2× YT 培养基（含 30 μg/ml 卡那霉素、50 μg/ml 氨苄青霉素），37℃振荡培养过夜。取 2 ml 培养物（剩余的保存在甘油中）离心获得沉淀，用 200 μl TE 50/10 悬浮细胞，600 μl 碱性 SDS 裂解细菌并用 450 μl 7.5 mol/L 乙酸铵中和。倒转混匀，冰上孵育 10 min。16 000 *g* 离心 15 min，将上清移至含 700 μl 异丙醇的新管。混匀并 16 000 *g* 离心 10 min。用 200 μl TE 50/10 重悬沉淀。用 100 μl 7.5 mol/L 乙酸铵在冰上 15 min 以沉淀蛋白质，16 000 *g* 离心 10 min。用 70%乙醇洗涤沉淀，重悬于 50 μl 含 50 μg/ml RNase A 的 TE 10/1 中。

(9) 用 *Not*I 酶解 5 μl 样本进行脉冲场凝胶电泳，以判断基因表达盒是否成功插入和有无基因组插入物的缺失。

(10) 如果在 PAC 插入片段中出现内部的 *Not*I 位点，进行克隆的 PCR 扩增以明确基因表达盒的插入位点靠近载体，而不位于基因组中。

取一个克隆用 500 μl 去离子水稀释，涡旋混匀，100℃ 变性 5 min。16 000 *g* 离心 5 min，沉淀细菌碎片。用 5 μl 上清作为 PCR 模板、针对基因表达盒氨苄青霉素（AMP1）或 EGFP（EGFP1）区特异性的引物以及针对 PAC 载体的 P1 裂解复制子（P1 lytic replicon，PAC4）区或 sacB 区（PAC2）特异性的引物进行 PCR 反应。

用薄壁聚碳酸酯 96 孔板在冰上配制 PCR 反应液：5 μl 上清模板，1 μl 上游引物（AMP1 或 EGFP1）5 pmol/μl，1 μl 下游引物（PAC4 或 PAC2）5 pmol/μl 和 3 μl 去离子水。

用一滴矿物油覆盖表面。在冰上制备反应的主要混合物如下（*n* 是 PCR 反应的数量，乘以 $n+1$）：2 μl 2 mmol/L dNTP（Pharmacia）；0.4 U AmpliTaq 聚合酶（Perkin-Elmer）；2 μl 10× PCR 缓冲液（含 15 mmol/L $MgCl_2$）；加去离子水至 10 μl。在 PCR 热循环仪中，将 96 孔板于 94℃孵育 2 min，然后在每孔中加入 10 μl 缓冲液/dNTP/*Taq* 混合液进行降落 PCR 扩增：5 个循环的 94℃ 30 s、55℃ 40 s（在 5 个循环中，将退火温度在每个循环中降低 1℃，降至 51℃）和 72℃ 30 s，然后 35 个循环的 94℃ 30 s、50℃ 40 s、72℃ 30 s（每循环增加 1 s 的延伸时间）。

(11) 取 2 μl 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。选择将基因表达盒按预期工作和转染要求定向插入 PAC 载体的克隆。

3.2 角质形成细胞的培养和转染

本节讲述角质形成细胞细胞系在低钙培养基中的常规培养以避免细胞分化，并详细介绍了用整合素靶向肽将大 PAC 分子稳定转染进角质形成细胞的操作步骤。

3.2.1 角质形成细胞的传代培养

角质形成细胞在添加了牛垂体提取物和表皮细胞生长因子的无血清角质形成细胞专

用培养基中维持培养。在含 6%CO_2、37℃ 的湿化孵箱中用 75 cm^2 培养瓶培养角质形成细胞至融合。

（1）吸去培养基，用胰蛋白酶-EDTA 混合液简单漂洗细胞，吸去液体。不用 PBS 洗涤角质形成细胞，因为它们不耐受高盐环境。

（2）用 4 ml 胰蛋白酶-EDTA 使细胞分离，加入 4 ml 含 10% 胎牛血清的角质形成细胞培养基灭活胰蛋白酶。

（3）细胞于 200 *g* 离心 5 min，吸弃上清，用 2 ml 角质形成细胞培养基悬浮细胞。

（4）如果需要转染，可用血细胞计数板进行细胞计数。

（5）另外，对于常规培养，以 1∶3 的比例稀释传代，培养在 75 cm^2 培养瓶中。

（6）通过将不同浓度的嘌呤霉素（0.5～3 μg/ml）加入完全角质形成细胞培养基中培养细胞，确定筛选稳定转染细胞所需的嘌呤霉素的浓度。理想的浓度是可以在筛选 2～3 周后 100%杀死未转染细胞。

3.2.2 角质形成细胞的转染

转染的前一天，在 10 cm 培养皿中接种 1×10^6 个角质形成细胞。第二天，确保细胞达到 70%融合。

（1）按下述方法在 15 ml Falcon 管中制备 4 份单独的预混合液［见注意事项（3）］：3 μl 脂质体转染试剂（lipofectin）；240 μl 0.1 mg/ml 肽段；4 μg PAC DNA［用 Tip-100 柱制备，加入灭菌 TE，视需要进行线性化处理，见注意事项（4）］与 600 μl 150 mmol/L NaCl 混合。

（2）按上述顺序依次加入各组分，每加入一组分后轻弹管壁混匀。

（3）预混合液在室温孵育 2 h。

（4）向每管预混合液中加入 OptiMem 培养基（预热至 37℃），使总体积至 2.5 ml。

（5）吸去 10 cm 细胞培养皿中的培养基，在摇动培养皿的同时逐滴加入转染预混合液（4×2.5 ml）。

（6）将培养皿放回 37℃ 孵箱，孵育 5 h。

（7）吸出转染混合物，换用角质形成细胞培养基，置培养箱再培养 19～31 h。

（8）用荧光倒置显微镜（汞灯光线透过一个 FITC 滤片，激发波长 488 nm，发射波长 512 nm）观察活细胞。表达 EGFP 的细胞呈绿色荧光，观察数个视野下表达细胞的百分率可用来初步判断转染效率。

3.2.3 转染细胞的筛选及扩增

（1）根据事先选定的最佳浓度，在转染 48～72 h、细胞分裂已开始后加入嘌呤霉素进行筛选。

（2）使细胞在筛选压力下生长 2～3 周，每 3～4 d 更换新的选择性培养基。

（3）在培养皿表面会生长出荧光克隆。当克隆足够大时，可以进行克隆挑取，但也不要太大，以免会生长融入其他克隆，每个克隆均可挑取后进行扩大培养［见注意事项（5）］。

（4）在培养皿的背面用笔在要挑取的克隆处做好标记。

(5) 吸去培养基，用镊子夹起一个灭菌克隆环，并将其一边浸入高压灭菌的凡士林中。

(6) 将环放在克隆周围，用手指轻柔但稍加压力使环能通过凡士林的黏附在克隆周围形成一个好的密封圈。

(7) 向环内加入 50 μl 胰蛋白酶-EDTA 混合物，将细胞放回培养箱孵育 2～3 min，然后在环内吹打胰蛋白酶使克隆脱落。

(8) 将细胞移入 24 孔板的孔中，孔中已加入不含嘌呤霉素的角质形成细胞培养基。对每个用克隆环圈出来的克隆重复如上操作。

(9) 生长 2～3 d 后，重新使用嘌呤霉素选择培养基，使细胞在孔中生长至融合。此时，将它们移入 12 孔或 6 孔板中继续扩增，直到有足够的细胞用于分析研究。

(10) 尽量早地冻存部分克隆化的细胞，做好新转染细胞的储备，为扩增细胞过程中出现污染时备用。

3.3 分析角质形成细胞基因组的 PAC 整合情况

本节讲述 FISH 和 Southern 印迹的补充技术用于分析 PAC 的整合。PAC 整合位点在染色体上的定位用 FISH 分析，同时也可了解 PAC 的拷贝数。已整合 PAC 拷贝数的定量测定可以通过 Southern 印迹进行。已整合 PAC 的完整性可通过使用 PAC 上感兴趣的 PAC 载体/基因特异的杂交探针同基因组 DNA 的酶切产物进行 Southern 印迹来明确，该限制性内切核酸酶不对 PAC 重组区进行切割［见注意事项（6)］。

3.3.1 有丝分裂中期 FISH (Metaphase FISH)

采用两种探针——未经改建的 PAC 重组载体和 pPBKG 质粒同角质形成细胞克隆的中期染色体进行杂交。用不同的颜色标记探针，使内源性信号（只有 PAC）能与整合信号（PAC 和质粒）区分开来。

3.3.1.1 中期染色体涂片的制备

(1) 在含 5 ml 培养基的 25 cm^2 培养瓶中培养出生长活跃的角质形成细胞，再加入 100 μl 10 μg/ml 的乙酰甲基秋水仙碱。

(2) 37℃ 孵育 1 h，胰蛋白酶消化，250 g 离心 5 min，弃上清。

(3) 用 7 ml 预热至 37℃ 的 75 mmol/L KCl 重悬细胞沉淀，37℃孵育 10～20 min［见注意事项（7)］。

(4) 250 g 离心 5 min，弃上清，轻弹离心管，用残余的少量液体悬浮细胞。

(5) 加入一滴甲醇：冰醋酸固定剂（3：1)，轻弹管壁混匀，加入两滴固定剂，再次轻弹管壁混匀，直到加入 5 滴固定剂。这样逐滴加入固定剂防止细胞的不可逆转成团。

(6) 加入固定剂至体积为 10 ml，250 g 离心 5 min，弃第一遍固定剂。

(7) 加入第二、第三遍固定剂进行固定（此时逐滴加入已无必要)，将最后一遍 10 ml固定剂悬浮的细胞于－20℃保存过夜。

(8) 用新配制的固定剂清洁显微镜载玻片，滴一滴固定的细胞悬液，自然干燥。

（9）将载玻片与干燥剂一起保存在－20℃过夜 。

3.3.1.2　探针标记

（1）为标记探针，在冰上配制以下液体（每一探针一管）：

a. 500 ng PAC 或质粒 DNA

b. PAC 标记用 1.25 μl 0.2 mmol/L Spectrum Red dUTP，质粒标记用生物素标记的 dUTP（用水稀释，避光保存）

c. 2.5 μl 0.1 mmol/L dTTP（用水稀释）

d. 5 μl 0.1 mmol/L dNTP 混合物（dATP、dCTP 和 dGTP，用水稀释）

e. 2.5 μl 缺口平移缓冲液

f. 5 μl 缺口平移酶

g. 加 H_2O 至 25 μl

上述 c～g 中的试剂来自缺口平移试剂盒。

（2）充分混匀，16℃孵育 4 h。取 100 ng 进行 2%琼脂糖凝胶电泳，确定标记是否完全，并观察拖尾的大小，应该为 200～600 bp，如果拖尾太大，继续孵育 2～4 h（PAC 可能总共需要 8 h 的孵育时间）。

3.3.1.3　探针的纯化

（1）用乙醇沉淀法从探针混合物中去除没有掺入的核苷酸。

（2）将下列试剂加入 25 μl 已标记的探针：6.25 μl 10 mg/ml tRNA：10 mg/ml 鲑鱼精 DNA（1∶1)；0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc，pH 5.2；2 倍体积的冰冷无水乙醇。

（3）颠倒混匀，－20℃保存过夜。

（4）于 4℃下 16 000 *g* 离心 20 min，用 50 μl 70%乙醇洗两次沉淀，空气中自然干燥。用 TE 溶解至浓度 20 ng/μl。

（5）－20℃保存。

3.3.1.4　载玻片的制备

在与 DNA 探针杂交前，需要把目标 DNA 变成单链。使用 70%甲酰胺可将变性温度降至 70℃，这样可以保留染色体的形态。

变性时间取决于载玻片的出厂时间，对一批新的玻片要在一个变性时间范围内测试其信号强度和染色体的形态变化情况。理想的变性时间可以保留一些 G 带并产生明亮的信号。

（1）在打开之前加热载玻片盒至室温。

（2）将 50 ml 70%甲酰胺、0.6× SSC 加入 Coplin 缸内，将缸置于 71℃水浴中，确保水位达到缸的颈部以使甲酰胺保持恒定的温度。

（3）将载玻片浸入甲酰胺（一次三片）2～3 min，然后浸入盛有冰冷 2× SSC 的第二个 Coplin 缸中 5 min。确保载玻片按浸入时的同样顺序移出变性缓冲液。

（4）将载玻片浸入系列乙醇溶液中脱水：盛有 70%、95%、100%和 100%乙醇的 Coplin 缸，每个缸中至少浸泡 30 s。

（5）在空气中自然干燥载玻片。

3.3.1.5 制备探针

大片段 PAC 探针中的重复序列用未标记的 Cot-1 预退火。

(1) 在 0.2 ml PCR 管中配制下列试剂：4 μl 标记 PAC 探针（20 ng/μl），5 μl 50%甲酰胺，10% 硫酸葡聚糖，2× SSC，以及 1 μl Cot-1（2 μg/μl）。

(2) 80℃变性 5 min，37℃ 孵育 20 min，让重复序列预退火。

(3) 质粒探针不需要与 Cot-1 竞争。将 4 μl 标记 pPBKG 探针与 5 μl 50% 甲酰胺、10% 硫酸葡聚糖、2× SSC 混合。

(4) 80℃ 变性 5 min，然后冰上放置 5 min。

(5) 轻轻向涂布有丝分裂中期细胞的玻片上哈气以显示细胞所在的位置，在玻片的背面用防水笔将这一区域圈出。

(6) 混合 DNA 探针，向细胞涂布点加入 1 μl 探针混合物。

(7) 用 6 mm 圆形盖玻片覆盖，并以橡胶封固剂密封，于湿盒内 37℃孵育 3 d。

3.3.1.6 探针检测

(1) 用镊子去除盖玻片密封剂，将载玻片插入 2× SSC 溶液中使盖玻片脱离。

(2) 将载玻片孵育在如下的液体中进行严格的漂洗：50% 甲酰胺、1× SSC 中 37℃ 10 min；2× SSC 中 43℃ 5 min；1× PBS 中室温 5 min。

(3) 将载玻片放置在纸巾上几秒钟以沥干水分，但不要使其干透。

(4) 在载玻片上加 80 μl 封闭缓冲液，并用 22 mm×50 mm 的盖玻片覆盖。

(5) 室温下于水平位置孵育 10 min。

(6) 将载玻片浸入装有 PBS/0.1% Tween-20 的 Coplin 缸中，去除盖玻片。

(7) 将载玻片移入含 PBS/Tween 的片盒，放置在摇床上 3 min。

(8) 更换新的 PBS/Tween，再轻摇 3 min。

(9) 短暂地沥干载玻片上的水分，向载玻片上滴 80 μl 链亲和素-FITC 的稀释液，覆盖盖玻片后 37℃避光孵育 30 min。

(10) 如前去除盖玻片，在摇床上用 PBS/Tween 漂洗两遍，然后在载玻片上加入 80 μl 生物素标记的山羊抗链亲和素抗体稀释液。

(11) 再重复前述的覆上盖玻片、孵育、去除盖玻片、漂洗步骤，然后加入 80 μl 链亲和素-FITC。

(12) 移除盖玻片，如前漂洗，并在空气中风干（避光），加入 25 μl To-Pro-3 作为封片剂并盖上盖玻片。

(13) 放置 15 min 后在激光共聚焦显微镜下观察。

(14) 记录强信号的中期染色体的标尺基准，并用适当的软件捕捉图像。

(15) 确定每个中期细胞染色体的平均数值，以备随后用于拷贝数的定量（见 3.2.2.2）。

3.3.1.7 染色体涂染

(1) 将载玻片浸入 PBS/Tween 中 15 min 以去除盖玻片，更换新鲜的 PBS/Tween 再浸泡 15 min，然后用 1× PBS 浸泡 15 min，最后置空气中自然干燥。

(2) 将染色体染料于 72℃变性 10 min，然后于 37℃预退火 60～90 min。

(3) 在载玻片上滴加 1 μl 变性的染料，盖上盖玻片，用橡胶密封，于湿盒中 37℃

杂交过夜。

(4) 去除盖玻片，如前彻底漂洗。

(5) 空气中自然干燥，在玻片上滴 25 μl Yo-Pro-1，并盖上盖玻片。

(6) 放置 15 min，如前用标尺基准分析中期染色体分裂相，以定位相同的中期染色体。

3.3.2 定量 Southern 印迹

3.3.2.1 探针制备

在 30 μl 反应体系中，用 15 U *Hin*dIII 酶解 2 μg pPBKG，37℃ 3 h。然后在 1% 低熔点凝胶上、1× TAE 缓冲液中进行电泳分离，用凝胶提取试剂盒（如 QIAquick gel extraction kit），根据使用说明书，对 3 kb 片段进行胶纯化。

3.3.2.2 酶解及膜的制备

(1) 用标准方法制备转染及未转染（阴性对照）角质形成细胞克隆的基因组 DNA 。

(2) 在 150 μl 反应体系中用 50 U *Not*I 分别酶解 5 μg 转染和 5 μg 未转染角质形成细胞的基因组 DNA，37℃ 3 h。

(3) 在 10 个 Eppendorf 管中将 pPBKG DNA 进行倍比稀释，范围从 2000 pg 至 0.1 pg。

(4) 每管中加入 5 μg 未转染角质形成细胞的 DNA [见注意事项 (8)]，在 150 μl 反应体系中用 50 U *Not*I 消化，37℃ 孵育 3 h。

(5) 于 −20℃过夜，沉淀所有的酶解产物。4℃下全速离心 30 min，用 20 μl 溶液重悬。

(6) 在 1%琼脂糖凝胶上，将 pPBKG 的系列稀释液上样在转染与未转染角质形成细胞 DNA 酶解产物的旁边。

(7) 采用标准程序进行 Southern 印迹，将 DNA 转移到带正电荷的 Hybond N^+ 尼龙膜上。

(8) 将此膜在 42℃ 甲酰胺杂交缓冲液中预杂交至少 4 h。

(9) 与 100 ng α-^{32}P 标记（用 Megaprime 标记系统）的 pPBKG *Hin*dIII 酶切片段在新鲜配制的杂交液中于 42℃杂交 16 h。

(10) 在 0.5% SDS、0.5× SSC 中，室温下振荡漂洗杂交膜 30 min，然后在新鲜配制的 0.5% SDS、0.5× SSC 中于 65℃下漂洗 30 min。如果有必要的话，还可以增加严格漂洗的次数。

(11) 将膜包裹在塑料包装纸中，在暗盒（如 PhosphorImager 盒）中曝光。

(12) 使用密度分析等方法，如采用 ImageQuant 软件来定量转染角质形成细胞 DNA 条带中 7 kb 片段的密度值，并将其与对照的 pPBKG 系列稀释的密度值进行比较，计算出整合 PAC 重组载体的有效质量。

(13) 拷贝数通过下列公式计算：

拷贝数=（细胞染色体数目/23）×（重组载体的有效质量/5 μg）×（单倍体基因组大小/对照质粒的大小）

染色体数目之前已测定过（见 3.3.1.6），单倍体基因组大小约 3.3×10^9 bp ，pPBKG 质粒长度是 10 258 bp。

4 注意事项

（1）首次离心后，上清液经灭菌纱布过滤到干净的离心管中进行二次离心。首次离心后的细菌碎片形成的沉淀往往是疏松地黏附在管壁，在倒转离心管的时候沉淀会脱落。这种情况通常难以避免，这是由于延长离心并不能改善沉淀的黏附，而增高离心的速度又会损坏离心管。为了克服这个问题，纱布可以放置在漏斗内，并轻轻挤压使上清通过，同时阻止非常黏稠的碎片进入第二支离心管。重复离心可以使上清/冲洗缓冲液快速流过随后将要使用的 Tip-100 柱，但柱子的阻塞仍时有发生。这时可将 10 ml 注射器的内芯插入 Tip-100 柱以加速流出，轻柔加压可以推进溶液流过 Tip-100 柱。这对实验方案后期的 PAC DNA 回收产量或质量均无影响。

（2）大分子 DNA 对破碎非常敏感，因此在整个操作 PAC 的过程中为避免剪切力（shearing），应使用切除尖端的吸头（用手术刀去除黄色吸头尖端最细的 3～5 mm 这段）。无论是大量和小量的 PAC 提取操作，不要使用涡旋混匀器进行重悬或混合，使用轻弹或倒转试管的方法即可。

（3）在进行大分子 DNA 的稳定转染之前，可先进行较小标记重组载体的转染来确定脂质体∶肽∶DNA 的最佳比率，如转染 pPBKG 到角质形成细胞。已经测得转染 HaCaT 和 MRC5 细胞的最佳比率约为 0.75∶6∶1[8]，但这个比率会随角质形成细胞培养情况的不同而发生变化。如果预混合液中加入的 PAC DNA 超过 4 μg，当加入肽的时候就会出现沉淀，因此如要转染 16 μg PAC DNA，可分别配制 4 个单独的预混合液（4×4 μg）。

（4）PAC DNA 在转染前可在重组载体上本来就有或经基因工程修饰后的单一位点上进行线性化，但这并不是必需的，并且可能降低转染效率，因为 DNA 此时会不那么紧密。然而，由于在整合到基因组 DNA 之前，重组载体会至少在一个位点上断裂，提前线性化有助于主动选择断裂位点，还可能避免断裂发生在感兴趣的基因或重要的已知调节区域（假设在转染过程中不会发生其他的断裂情况）。

（5）如果克隆生长得太大，甚至与其他克隆互相融合，可将一孔中的细胞进行系列的倍比稀释，并将其转入 12 孔板中的数个孔，几周后可以对不同大小的克隆进行挑取。对一些角质形成细胞使用挑取克隆的方法不能获得良好的效果，因为一个克隆内细胞数目太少，细胞与细胞的接触不良不能提供足够的生长刺激。如果发生这种情况，可以进行所有群体的选择。后面进行的群体 FISH 分析可以测定一个群体内的整合数量及生成细胞数量。

（6）随着人类基因组计划的实施，可以做到测定 PAC 重组载体的全序列。重组载体的限制性酶切图谱可用于选择限制性内切核酸酶，如用 *Not*I 酶切可显示出特征性的类型，也可用于 Southern 印迹实验。这些条带可同 PAC 重组载体或 PAC 载体区域内感兴趣基因的 5′/3′端片段进行杂交。应选择可以覆盖整个重组载体的几种限制性内切核酸酶，以更准确地呈现整合 PAC 的完整性。

（7）用低渗 KCl 溶液处理细胞的时间因细胞而异，因此需先用非转染角质形成细胞优化条件。如果作用时间过短，细胞质会包裹中期染色体使其不能很好地铺展，而时

间过长则细胞破裂使染色体丢失到溶液中。

(8) pPBKG DNA 的系列稀释样本是通过比较条带的密度来定量 PAC 的拷贝数，并作为含整合 PAC 基因的角质形成细胞基因组 DNA 中期望出现的 pPBKG *Not*I 酶切片段的大小参照。由于在琼脂糖凝胶中，纯质粒 DNA 往往较基因组 DNA 迁移快，若在 pPBKG 酶切产物中存在未转染角质形成细胞 DNA，此背景可保证所有 DNA 样本以同样的速度迁移，能更精确地判断条带的大小。

致　谢：作者衷心感谢 José Mejía 博士在完善本操作步骤中的大力帮助，也感谢 Andrew Jefferson 的协助。

(陈　建译　罗向东校)

参考文献

[1] Yang, X. W., Model, P., and Heintz, N. (1997) Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* **15**, 859—865.

[2] Antoch, M. P. (1997) Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* **89**, 655—667.

[3] Burke, D. T., Carle, G. F., and Olsen, M. V. (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**, 806—812.

[4] Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., et al. (1994) A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.* **6**, 84—89.

[5] Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. P., and Stewart, A. F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* **20**, 123—128.

[6] Meja, J. E. and Monaco, A. P. (1997) Retrofitting vectors for *Escherichia coli* based artificial chromosomes (PACs and BACs) with markers for transfection studies. *Genome Res.* **7**, 179—186.

[7] Hart, S. L., Arancibia-Carcamo, C. V., Wolfert, M. A., Mailhos, C., O' Reilly, N. J., Ali, R. R., et al. (1998) Lipid-mediated enhancement of transfection by a non-viral integrin-targeting vector. *Hum. Gene Ther.* **9**, 575—585.

[8] Compton, S. H., Mecklenbeck, S., Meja, J. E., Hart, S. L., Rice, M., Cervini, R., et al. (2000) Stable integration of large (>100 kb) PAC constructs in HaCaT keratinocytes using an integrin-targeting peptide. *Gene Ther.* **7**, 1600—1605.

[9] Wohlgemuth, J. G., Kang, S. H., Bulboaca, G. H., Nawotka, K. A., and Calos, M. P. (1996) Long-term gene expression from autonomously replicating vectors in mammalian cells. *Gene Ther.* **3**, 503—512.

[10] Huertas, D., Howe, S., McGuigan, A., and Huxley, C. (2000) Expression of the human CFTR gene from episomal *oriP-EBNA*-1-YACs in mouse cells. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 617—629.

[11] Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1998) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761—771.

第 33 章 小鼠表皮的定向体细胞突变

Daniel Metzger，Mei Li，Pierre Chambon

摘 要：在特定的时间对皮肤特定细胞类型中的给定基因有效地导入体细胞突变将极大地促进对表达于皮肤中大量的基因进行研究，也有助于制作皮肤疾病的动物模型。在这里，我们叙述了运用条件 Cre/LoxP 系统对皮肤靶基因进行时空可控性的体细胞突变的策略和技术。它们是基于嵌合性 Cre 重组酶 Cre-ER^{T2} 的细胞特异性表达来实现的，抗雌激素药如他莫昔芬（Tam）可以诱导 Cre-ER^{T2} 的活性，Cre-ER^{T2} 可通过 Cre 重组酶融合人雌激素受体 α（ERα）的突变配体结合域来获得。现在我们以敲除成年小鼠表皮基底部角质形成细胞中的维甲酸 X 受体 α（RXRα）为例来进行说明。

关键词：皮肤；Cre；维甲酸 X 受体 α（RXRα）；角质形成细胞；敲除；他莫昔芬

1 导言

小鼠基因打靶对了解特殊基因产物在哺乳动物发育和成体病理生理学中所起作用方面已取得显著的进展。然而，对生殖系统进行定向突变存在一些固有的限制，例如，伴随着胚胎致死现象出现的一些难题，发育过程中产生畸变，或者由功能性多余基因导致的代偿效应。在许多情况下，这些限制阻碍了对动物生命的某一特定时期特定细胞亚型的特定基因产物的机能进行测定，而且不允许为人类疾病制作出由体细胞突变导致的小鼠模型，特别当这些疾病是由多种体细胞突变的组合所引起时，如各种形式的癌症[1,2]。因此，已开发出能达到条件性基因失活的方法，这些方法主要是基于噬菌体 P1 位点特异的 Cre 重组酶的特性，因为 Cre 重组酶可有效切除动物细胞中以 LoxP 位点为两侧翼的 DNA 片段（floxed DNA），空间或时间控制的体细胞突变可通过在具有细胞特异性或可诱导的启动子下游导入 *Cre* 基因来实现[3]。然而，这些条件基因打靶系统仍有很多局限性，因为它们或者只受空间控制，或者只受时间控制。最近，已研发出可在动物生命中特定时间和特定类型细胞中对特定基因发生体细胞突变的两种系统。首先，将 Cre/LoxP 系统连接到四环素依赖性调节系统中。时空控制的 Cre 重组酶表达可通过用脱氧土霉素（一种四环素类似物）对包含两个转基因的转基因小鼠进行处理来获得。这两个转基因分别编码：①一个在组织特异性启动子调控下的受四环素调控的反式作用因子；②一个在含有 tet 操纵子操纵位点的最小启动子调控下的 Cre 重组酶。然而，生产同时携带这两个基因和以两个 LoxP 为侧翼的特定等位基因的转基因小鼠需要复杂的繁殖，而且需要进一步改善以消除 Cre 表达的基础水平[4,5]。其次，将 Cre 重组酶与甾体激素受体的突变配体结合域融合可在体内产生出配体诱导的重组酶活性[6,7]。Cre-ER^{T2} 就是这些融合蛋白质的一种，并且非常有效。将 Cre 融合到突变的人类雌激素受

体 ERα 配体结合域可获得 Cre-ER^{T2}。Cre-ER^{T2} 在转基因小鼠细胞中特异性的表达可以有效地使他莫昔芬依赖性 Cre 介导的重组出现于两个 LoxP 位点之间，且无背景活性，从而以时空可控的方式产生出位点特异性的体细胞突变[8]。

皮肤是由表皮及其附属物（毛囊），以及真皮组成的复杂器官。表皮是具有高度活力的复层上皮，主要由角质形成细胞组成[9]。最深部附着于基底膜的基底细胞，形成一个增生层，在这里角质形成细胞周期性地退出细胞分裂周期，走向终末的分化，同时迁移入上基部层。终末分化的角质形成细胞形成的角化层，每天都会从皮肤表面脱落，并且不断地被新分化的细胞所取代。通过胚胎发生时期的一系列间充质-上皮相互作用发育而成的毛囊也是一个动态的组织结构。它们也主要由角质形成细胞组成，其外根鞘连接于表皮的基底层。当毛囊形成后，周期性地经历着退化、静息和生长的循环过程。经过这种循环，旧毛发最终被新生毛发取代[10,11]。

在皮肤各层时序可控的体细胞基因打靶突变应该可以了解在皮肤中表达的许多基因的功能，同时可以制作皮肤病的动物模型。本章介绍了对皮肤中某些靶基因进行时空可控性体细胞突变的策略和技术，我们将通过选择性敲除基底层角质形成细胞中的 RXRα 来说明。

2 材料

2.1 抗体

生物素标记的小鼠单克隆 2CRE 2D8-1-2 抗体（Euromedex，Mundolsheim，France；cat. no. MAB3120）。

2.2 转基因小鼠

（1）RXRα$^{af2(I)}$ 小鼠[12]（e-mail：chambon@titus. u-strasbg. fr）。

（2）RosaR26R 小鼠[13]（从 P. Soriano 获得；e-mail：psoriano@fhcrc. org）。

（3）RXRα$^{L2/L2}$ 小鼠[14]（e-mail：chambon@titus. u-strasbg. fr）。

2.3 试剂

2.3.1 基因组 DNA 的提取

（1）蛋白酶 K 储存液（10 mg/ml）：100 mg 蛋白酶 K（Sigma Chimie，St. Quentin Fallavier，France；cat. no. P-6556）溶解于 10 ml 蒸馏水中，分装为 0. 5 ml，于－20℃储存。

（2）蛋白酶 K 消化缓冲液（50 mmol/L Tris，pH 8. 0；5 mmol/L EDTA；1% SDS；0. 2 mol/L NaCl）。按下列顺序配制 800 ml：40 ml 1 mol/L Tris-HCl，pH 8. 0；500 ml 蒸馏水；8 ml 0. 5 mol/L EDTA；40 ml 20%SDS；32 ml 5 mol/L NaCl；180 ml 蒸馏水。

（3）稳定酚（Tris 饱溶液和，pH 7. 5 ～ 8；Eruobio，Les Ulis，France；cat. no. 018335）。

2.4 基因分型

（1）10× PCR 缓冲液：500 mmol/L KCl；100 mmol/L Tris-HCl，pH 8.8；15 mmol/L $MgCl_2$。配制 100 ml 方法如下：50 ml 1 mol/L KCl；10 ml 1 mol/L Tris-HCl，pH8.8；1.5 ml 1 mol/L $MgCl_2$；38.5 ml 蒸馏水。用孔径为 0.22 μm 的过滤器过滤（Millipore，Bedford，MA；cat. no. SCGPUOIRE）。

（2）*Taq* DNA 聚合酶（5U/μl，Sigma，St. Louis；cat. no. D4545）。

（3）dNTP（各 10 mmol/L），配制 1 ml 的方法：100 μl 100 mmol/L dATP（Amersham，Freiburg，Germany；cat. no. 27-2050-03）；100 μl 100 mmol/L dCTP（Amersham；cat. no. 27-2060-03）；100 μl 100 mmol/L dGTP（Amersham；cat. no. 27-2070-03）；100 μl 100 mmol/L dTTP（Amersham；cat. no. 27-2080-03）；600 μl 灭菌蒸馏水。分装为 100 μl，−20℃储存。

（4）引物：寡核苷酸（1 μg/μl 溶于水）储存于−20℃。301 bp Cre PCR 产物：TK139（5′-ATTTGCCTGCATTACCGGTC-3′）和 TK141（5′-ATCAACGTTTTCTTTTCGGA-3′）。194 bp $RXR\alpha^{af2(1)}$ PCR 产物：UN126（5′-CAAGGAGCCTCCTTTCTCTA-3′）和 RR189（5′-AAGCGCATGCTCCAGACTGC-3′）。183 bp $RXR\text{-}\alpha^{af2(1)}$ 和 138 bp 野生型（+）PCR 产物：UN126 和 UN127（5′-CCTGCTCTACCTGGTGACTT-3′）。701 bp RXRαL2 和 669 bp RXRα 野生型（+）PCR 产物：ZO243（5′-TCCTTCACCAAGCACATCTG-3′），ZO244（5′-TGCAGCCCTCACAACTGTAT-3′）。426 bp RXRαL-PCR 产物：ZO243 和 UD196（5′-TCACCTGGACTTGTCACCTAG-3′）。301 bp ROSA PCR 产物：VD23（5′-CGCCGACGGCACGCTGATTG-3′）和 VD24（5′-GTTTCAATATTGGCTTCATC-3′）。

（5）中性蛋白酶（Dispase，Invitrogen，Karlsruhe，Germany；cat. no. 17105-041）。

2.5 他莫昔芬处理实验

配制 1 mg/ml 他莫昔芬（Tam）溶解液如下：将 10 mg 他莫昔芬（Sigma；cat. no. T-5648）溶解于 1 ml 乙醇中，然后加入 9 ml 葵花籽油（食品杂货店购买）。涡旋混匀 2 min，超声处理 30 min，分装，可在−20℃储存数月。

2.6 Cre 的免疫组织化学检测

（1）冰冻包埋树脂（Cryomatrix；Shandon Inc，Pittsburg，PA；cat. no. 6769006）。

（2）Dulbecco 磷酸盐缓冲盐溶液（PBS；Sigma；cat. no. D5652）。

（3）CY3 结合的链亲和素（Jackson ImmunoResearch，West Grove，PA；cat. no. 016-160-084）。

（4）二脒基苯吲哚（Diamidino Phenylindole）（Roche DIAGNOSTICS，Mannheim，Germany；cat. no. 236276）。

（5）正常山羊血清（Vector，Burlingame，CA；cat. no. S-1000）。

（6）Vectashield 封固剂（Vector；cat. no. H-1000）。

2.7 LacZ 染色

（1）固定液（于4℃下新鲜配制）：2.5 ml 40%甲醛，0.4 ml 25%戊二醛，47.1 ml PBS（1×）。

（2）5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D半乳糖苷（X-gal）（Roche Diagnostics；cat. no. 745740）：以40 mg/ml浓度溶解于二甲基酰胺中，−20℃避光储存。

（3）β-半乳糖苷酶染色液（使用前配制）：43.65 ml PBS（1×），2.5 ml K-铁氰化物（0.1 mol/L），2.5 ml K-亚铁氰化物（0.1 mol/L），0.1 ml $MgCl_2$（1 mol/L），1.25 ml X-gal储存液（40 mg/ml），用0.22 μl孔径的过滤器进行过滤，避光。

（4）番红精染液（Merck，Darmstadt，Germany；cat. no. 1.15948），0.05%溶于水。

（5）正性甲氧苄二胺（Histosol plus，Shandon Inc；cat. no. histol+I）。

2.8 仪器设备

（1）PCR仪（Gene Amp PCR system 9700；Perkin-Elmer Corporation，Wellesley，MA）。

（2）恒冷切片机（Leica，Wetzlar，Germany；CM 3050S）。

（3）荧光显微镜（Leica DM LB Type 307-072.057）。

3 方法

详细叙述了对表皮基底层角质形成细胞中以LoxP位点为两侧翼的基因进行细胞特异的时序控制的定向体细胞突变的一个例子。

3.1 表皮基底层角质形成细胞中表达Cre-ER^{T2}的转基因小鼠的建立

3.1.1 K14-Cre-ER^{T2}转基因小鼠的产生

为在表皮基底层角质形成细胞中表达Cre-ER^{T2}，建立了含有Cre-ER^{T2}并且受角蛋白K14调节序列调控的转基因小鼠。为此目的，转基因位于Cre-ER^{T2}编码序列上游（图33.1A），所包含的2 kb人类K14启动子/增强子在正在分裂的表皮基底层角质形成细胞、毛囊外根鞘及其他一些复层扁平上皮（如口腔、舌上皮）[15]处于活化状态，可以注射到C57BL/6×SJL受精卵中[16]。至于转基因的构建及原代转基因小鼠（F_0）的建立方法[17,18]本章不予介绍。

3.1.2 K14-Cre-ER^{T2}原代转基因动物的鉴定

（1）从2周龄F_0小鼠取0.5 cm尾尖组织。

（2）提取基因组DNA：向尾尖活检组织中加入250 μl蛋白酶K消化缓冲液和7.5 μl蛋白酶K储存液（10 mg/ml）55℃孵育过夜。加入等体积的苯酚∶氯仿（1∶1），混匀，室温下15 000 *g*离心5 min。取上清，加入500 μl 95%乙醇沉淀DNA，15 000 *g*于室温下离心5 min。用70%乙醇洗涤DNA沉淀，空气中自然干燥，再用100 μl水溶

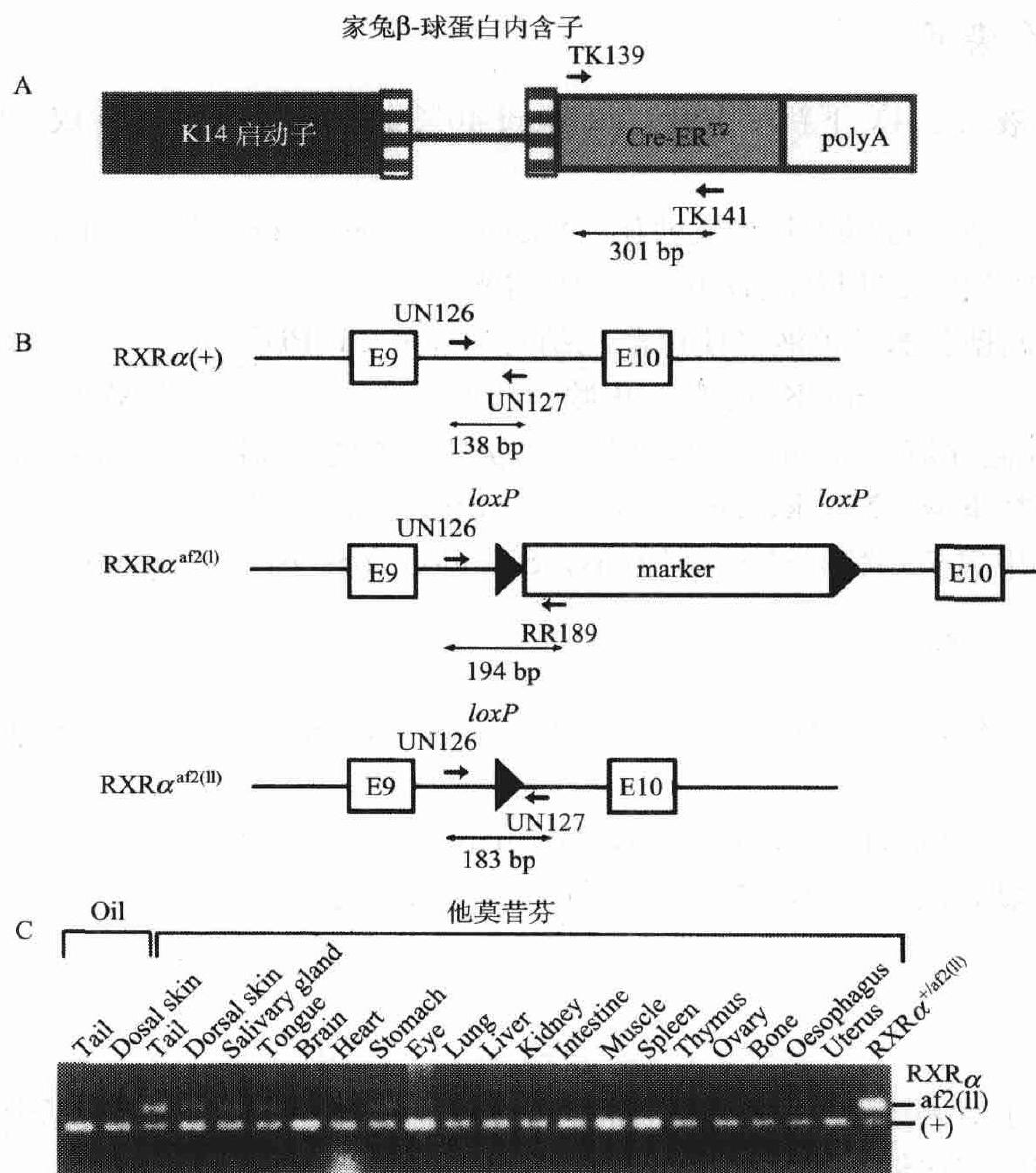


图 33.1　K14-Cre-ER^{T2}转基因链的特征

A. K14-Cre-ER^{T2}转基因的结构，人的 K14 启动子、Cre-ER^{T2}编码序列和猿猴病毒 40（SV40）多聚腺苷酸化信号（polyA）分别用黑色、灰色、白色框表示。家兔 β-球蛋白内含子（rabbit β-globin intron）和拼接供体与受体位点分别用直线和阴影框代表。B. RXRα 野生型（WT）、RXRα af2(I) 目标等位基因和重组 RXRα af2(II) 等位基因的基因组构造，以及用 PCR 鉴定这些 RXRα 等位基因的策略。C. PCR 检测 Tam 诱导的 Cre 介导的小鼠 DNA 敲除。葵花籽油（空白溶剂）或他莫昔芬（Tam）处理 K14-Cre-ER$^{T2(tg/0)}$/RXRα$^{+/af2(I)}$小鼠 1 d 后从所示器官中分离的 DNA，以及从 RXRα$^{+/af2(II)}$小鼠尾分离的 DNA（右边最后一个泳道）进行 PCR 分析，如图所示。可以看到从野生型（WT）RXRα 等位基因（+）和 RXRα af2(II) 中扩增出的 PCR 产物的位置。

解。DNA 可在 4℃下储存数周。

(3) PCR 基因分型。反应体系装于 0.2 ml PCR 反应管中，每个 PCR 反应体系包含以下成分：3 μl 10× PCR 缓冲液；0.6 μl dNTP（各 10 mmol/L）；0.06 μl 5′引物（1 μg/μl）（TK 139）；0.06 μl 3′引物（1 μg/μl）（TK 141）；0.2 μl *Taq* DNA 聚合酶；1 μl 基因组 DNA 和 20 μl 水，总体积 25 μl。将 PCR 反应管放入 PCR 仪，按下列程序运行：94℃，5 min；94℃20 s/55℃30 s/72℃5 s，28 个循环；72℃ 5～10 min。

用含有溴化乙锭染料的 2.0% 琼脂糖凝胶电泳来鉴定 PCR 产物[19]。301bp 的产物提示转基因存在（图 33.1A 和未显示的资料），可以确认 K14-Cre-ER^{T2}原代转基因小鼠构建成功。

3.1.3 原代小鼠通过生殖系传递转基因的鉴定

转基因原代小鼠与 C57BL/6 小鼠繁殖。对 2 周龄转基因原代小鼠后代 F_1 小鼠进行基因型鉴定（见 3.1.2）。

3.1.4 基底角质形成细胞表达 Tam 依赖性 Cre 重组酶活性的 K14-Cre-ER^{T2}转基因种系的鉴定

3.1.4.1 半定量分析在不同组织中 Cre-ER^{T2}介导的以 LoxP 位点为两侧翼的 DNA 敲除

为分析重组酶在 Cre-ER^{T2}转基因小鼠不同器官中的活性，F_1 代 Cre-ER^{T2}小鼠要与在常染色体两个等位基因中的任意一个含有以 LoxP 位点为两侧翼（LoxP-flanked，floxed）的 DNA 片段的小鼠繁殖，这样可以用一对简单的引物进行 PCR，识别 WT 和重组的等位基因。以此为目的，这里选用 $RXR\alpha^{+/af2(I)}$小鼠[12]（见图 33.1B）。

（1）繁殖 F1 K14-Cre-ER^{T2}和 $RXR\alpha^{+/af2(I)}$小鼠。

（2）后代的基因分型按 3.1.2 中描述的方法进行。用来鉴定 $RXR\alpha^{af2(I)}$等位基因的 PCR 引物是 UN126 和 RR189（PCR 产物为 194 bp；图 33.1B）。

（3）Tam 处理：每日给 8 周龄 K14-Cre-$ER^{T2(tg/o)}$/$RXR\alpha^{+/af2(I)}$小鼠腹腔内注射 100 μl Tam溶液（0.1 mg）或葵花籽油，注射 5 d，使用配有 25 G 针头的 1 ml 注射器。

（4）最后一次注射后的 1 d，以颈脱臼法处死用 Tam 和葵花籽油处理过的小鼠，并取其组织器官（如鼠尾、脑、食道、肺、心脏、肝、舌头、唾液腺、肠、肾、胸腺、眼、脾、肌肉、胃、睾丸/卵巢和子宫）。从不同样本中分离出基因组 DNA，进行 PCR 分析，方法如 3.1.2 所述，除了用引物 UN126 和 UN127 来扩增 183bp 的重组 $RXR\alpha^{2f2(I)}$等位基因［$RXR\alpha^{af2(II)}$］和 138bp 的野生型 RXRα 等位基因（见图 33.1B 和 C）以外。

（5）Tam 处理后显示出皮肤和鼠尾中 $RXR\alpha^{af2(I)}$等位基因有效地转换成 $RXR\alpha^{af2(II)}$等位基因的 K14-Cre-ER^{T2}种系和葵花籽油处理后（空白对照）没有出现转换的对照动物（见图 33.1C 和未显示的资料）将被筛选出来做进一步分析［见注意事项（1）］。

3.1.4.2 用免疫组化鉴定 K14-Cre-ER^{T2}系鼠皮肤中嵌合性 Cre 重组酶的表达类型

（1）按照 3.1.4.1 所述的方法给 K14-Cre-ER^{T2}小鼠注射 Tam 来诱导 Cre-ER^{T2}核易位[20]，这样有利于 Cre-ER^{T2}检测。最后一次注射的次日，从去除骨骼的尾尖取组织活检（或取去毛后的背部皮肤），将样本放入盛有冰冻包埋树脂 Cryomatrix 的模子中，置于干冰上冷冻。于－20℃储存组织块，直到用恒冷切片机将其切成 10 μm 厚的切片。

（2）Cre 免疫组织化学实验

a. 把冷冻组织切片固定在 2%多聚甲醛中，室温放置 5 min。

b. 用 PBS/Triton X-100 0.1% 洗涤三次，每次 5 min，再用 PBS 洗涤 5 min。

c. 在 PBS/5%正常山羊血清/Triton X-100 0.1%中于室温下孵育 30 min。

d. 用生物素化的小鼠单克隆抗体 2CRE 2D8-1-2（1∶1000 溶于 PBS/5%正常山羊血清/Triton X-100 0.1%）于室温下孵育 2 h，或 4℃过夜。

e. 用 PBS/Triton-X100 0.1%分别洗涤载玻片三次，每次 5 min，再用 PBS 洗涤 5 min。

f. 与 CY3 结合的链亲和素（1∶400 溶解于 PBS）室温下孵育 1 h。

g. 用 PBS/Triton-X 100 0.1%洗涤三次，每次 5 min，再用 PBS 洗涤 5 min。

h. 用含有 DAPI（10 μg/ml）的封固剂 Vectashield 封片。

i. 荧光显微镜下检查（激发光波长为 545 nm，发射光波长为 601 nm）。

3.1.4.3 细胞水平鉴定 K14-Cre-ER^{T2} 小鼠中重组酶的活性

在 Cre 介导的以 LoxP 位点为两侧翼的 DNA 敲除之后，大部分而不是所有基底层角质形成细胞显示出 Cre-ER^{T2} 表达的转基因小鼠与表达报告基因（如 LacZ、碱性磷酸酯酶或绿色荧光蛋白）的转基因种系进行繁殖。应注意目前已建立的 Cre 报告基因动物种系（ACZL、RosaR26R、Z/AP、Z/EG 等）不允许报告基因在成年小鼠的所有的细胞/组织中都表达[13,20~25]（未发表的结果）。这样，所要分析的转基因 Cre-ER^{T2} 小鼠种系与恰当的报告基因小鼠进行繁殖是很重要的。例如，在表皮角质形成细胞中，ACZL[25] 是基底层上的角质形成细胞的一个很好的报告基因种系，而基底角质形成细胞却不是[22]，但是在 Cre 介导的重组后 RosaR26[13]（以后称 $Rosa^{fl/+}$）在基底层和基底层上的角质形成细胞中均表达 LacZ[14]。

（1）用 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$ 和 $Rosa^{fl/+}$ 小鼠繁殖，并选择出具有 k14-Cre-$ER^{T2(tg/o)}$/$Rosa^{fl/+}$ 双转基因的后代，按照 3.1.2 中的方法用 PCR 做基因分型。用 ROSA f1 等位基因进行基因分型的引物为 VD23 和 VD24。

（2）按照 3.1.4.1 的步骤（3），每日给 8～10 周龄的 k14-Cre- $ER^{T2(tg/0)}$/$Rosa^{fl/+}$ 小鼠注射 0.1 mg Tam 或葵花籽油，注射 5 d。

（3）注射 Tam 后 5 d、30 d、60 d 分别取小鼠尾尖组织，并按照 3.1.4.2 的步骤（1）准备 10 μm 的冷冻组织切片。

（4）β-gal 染色

a. 用固定液在 4℃下浸泡载玻片 15 min。

b. 在室温下用 PBS 洗涤三次，每次 5 min。

c. 于 37℃下在 β-gal 染色液中孵育过夜（避光）。

d. 在室温下用 PBS 洗涤三次，每次 5 min。

e. 在蒸馏水中冲洗两次，每次 30 s［见注意事项（2）］。

f. 载玻片脱水：在 90%乙醇中 30 s；100%乙醇 30 s；100%乙醇 2 min；正性甲氧苄二胺浸泡两次，每次 3 min。

g. 封固载玻片。

h. 用光学显微镜镜检。

未经处理过的或用葵花籽油处理过的 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$/$Rosa^{fl/+}$ 小鼠皮肤组织未被 X-gal 染色，证明 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$ 小鼠的重组酶活性受到严格限制[8]。

小鼠尾部表皮基底层上的细胞在 5～10 d 后更新。开始注射 Tam 后 5 d，对表皮基底层部和基底层上的角质形成细胞，以及毛囊外根鞘进行 X-gal 染色，发现 Tam 可以很快地诱导出重组酶活性。此外，经 Tam 处理后 30 d 和 60 d，大多数而不是所有的表皮角质形成细胞和毛囊外根鞘可观察到 X-gal 染色，这表明，这一 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$ 转基因小鼠的表皮干细胞中已可以有效诱导出重组酶活性[8]。

3.2 以 RXRα 敲除为例的成年小鼠表皮角质形成细胞中靶基因的条件体细胞突变

为确定 RXRα 在成年小鼠表皮角质形成细胞中的功能，8～10 周龄小鼠基底角质形

成细胞的 RXRα 被条件性敲除。按照下列步骤进行。

3.2.1 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$/$RXR\alpha^{L2/L2}$ 小鼠和对照小鼠的建立

以 LoxP 位点为两侧翼的 RXRα（floxed RXRα）小鼠（$RXR\alpha^{L2/L2}$）与 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$ 小鼠繁殖。按 3.1.2 叙述的方法对 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$/$RXR\alpha^{L2/+}$ 小鼠后代进行基因分型鉴定。Z0243 和 Z0244 引物用于鉴定 RXRα L2 和（+）等位基因（图 33.2 A）；PCR 的反应程序为：94℃，5 min；94℃ 10 s/56℃ 30 s/72℃ 1 min，32 个循环；72℃ 5～10 min。K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$/$RXR\alpha^{L2/+}$ 小鼠与 $RXR\alpha^{L2/L2}$ 小鼠交配，用基因分型鉴定 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$/$RXR\alpha^{L2/L2}$ 后代（前突变体小鼠），以及 K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$/$RXR\alpha^{L2/+}$ 和 K14-Cre-$ER^{T2(0/0)}$/$RXR\alpha^{L2/L2}$ 同窝出生小鼠（对照小鼠）。

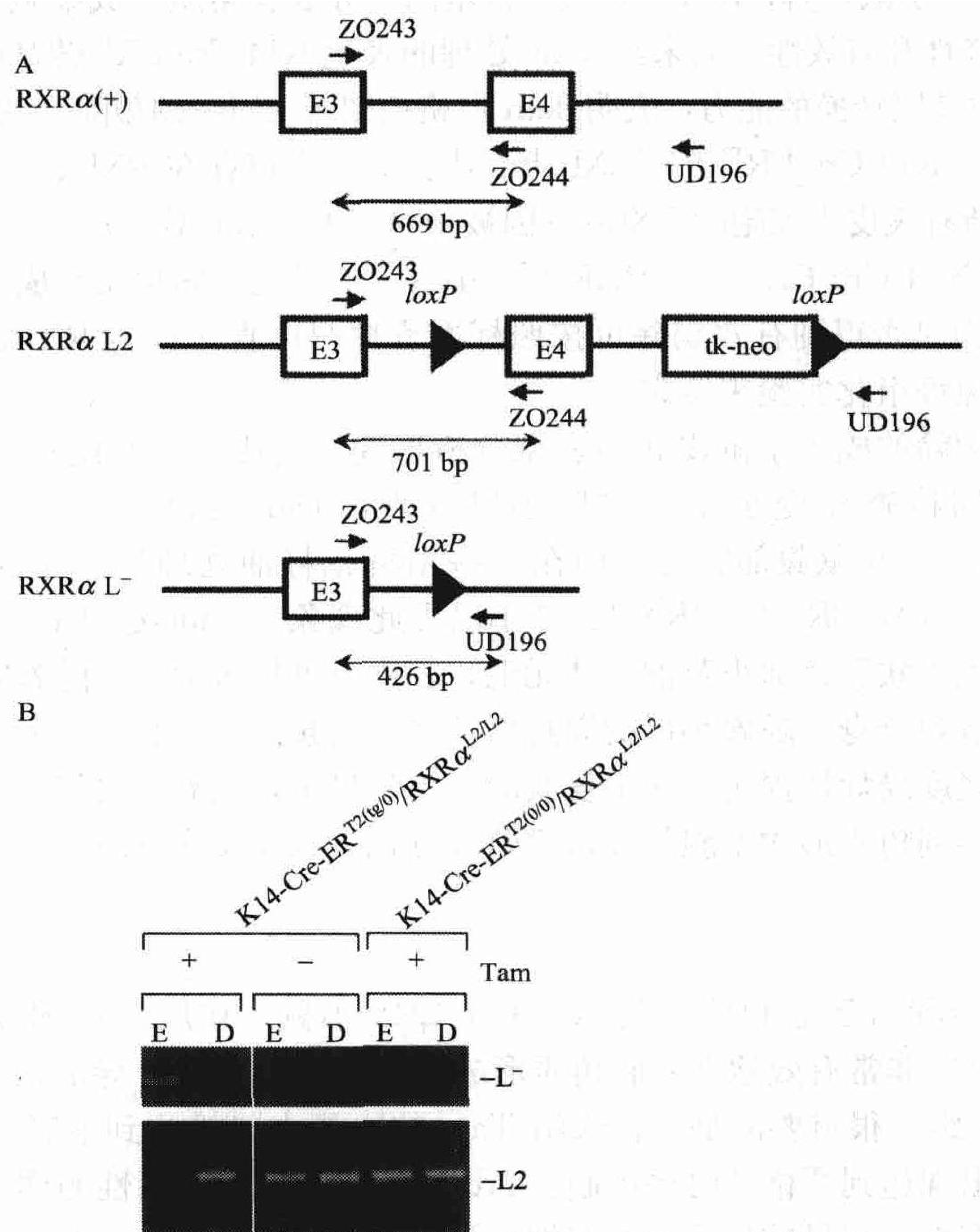


图 33.2 时间可控性敲除表皮角质形成细胞的 RXRα 基因

A. RXRα WT（+）基因组位点、以 LoxP 位点为两侧翼的 RXRα L2 等位基因，以及 Tam 诱导的 Cre 介导的外显子 4（E4）敲除后获得的 RXRα L⁻等位基因的示意图。图中标出了用来鉴定 RXRα+、L2 和 L⁻等位基因的 PCR 引物。箭头代表 LoxP 位点。B. K14-Cre-ER^{T2} 介导成年小鼠皮肤的 RXRα 重组的效率。K14-Cre-$ER^{T2(tg/0)}$/$RXR\alpha^{L2/L2}$ 小鼠和 K14-Cre-$ER^{T2(0/0)}$/$RXR\alpha^{L2/L2}$ 小鼠用 Tam（+）和葵花籽油（−）处理两周后，取其尾尖分别提取表皮（E）和真皮（D）的基因组 DNA，用 PCR 鉴定做 L2 和 L⁻RXRα 的等位基因。如图显示了与 RXRα L2 和 L⁻等位基因相应的 PCR 片段。

3.2.2 表皮基底角质形成细胞中时序控制的 RXRα 敲除

按照 3.1.4.1 的步骤（3），用葵花籽油或 Tam 处理 8～10 周龄性别且年龄匹配的 $K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2(tg/0)}/RXR\alpha^{L2/L2}$和同窝出生的对照小鼠。Tam 和葵花籽油处理 2 周和 8 周后分析鼠尾表皮中靶基因的敲除效率。为分离鼠尾活检标本的表皮与真皮，样本需在骨骼剔除后用中性蛋白酶（4 mg/ml 溶解于 PBS）4℃孵育过夜（或 37℃处理 2 h）。用镊子将真皮从表皮上分离下来，按照 3.2.1 介绍的方法提取基因组 DNA，并用 PCR 进行分析。引物 Z0243 和 UD196 用于扩增 RXRα L^- 等位基因（图 33.2A）。

图 33.2B 显示的实例证明，Tam 处理后两周，表皮中 RXRα L2 等位基因完全转换成 RXRα L^-等位基因，但在 $K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2}$表达小鼠的真皮中并未发生转化。这表明经 Tam 处理（$RXR\alpha^{ep-/-}$小鼠）后，$K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2}$转基因介导表皮角质形成细胞中 RXRα 体细胞基因敲除的选择性和有效性。而未经 Tam 处理的表达 $K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2}$转基因的对照小鼠缺乏 L2 向 L^-等位基因转换的能力，表明 Tam 严格控制着 RXRα 的敲除（图 33.2B）。而且，Tam 处理 8 周后 $K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2(tg/0)}/RXR\alpha^{L2/L2}$小鼠表皮中仅存在 RXRα L^-等位基因，提示大部分但不是所有表皮干细胞的 RXRα 基因被敲除（未显示的数据）。

Tam 处理 $K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2(tg/0)}/RXR\alpha^{L2/L2}$小鼠后，其毛囊间角质形成细胞和毛囊外根鞘中 RXRα 蛋白是否得到有效剔除可按照标准程序[8]用直接针对 RXRα 的抗体对皮肤活检组织进行免疫组化实验来鉴定。

靶基因被剔除的成年小鼠皮肤的表型分析可通过肉眼观察和组织学检查来进行研究。例如，每周检查突变小鼠和对照小鼠发现，Tam 处理 6～7 周后的 $K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2(tg/0)}/RXR\alpha^{L2/L2}$小鼠腹部脱毛，而在一些用葵花籽油处理过的相同基因型小鼠和 Tam 处理的 $K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2(tg/0)}/RXR\alpha^{L2/+}$小鼠无此现象。Tam 处理 12～16 周后，突变小鼠腹部大面积皮肤和背部小范围皮肤无毛，表皮下可见包囊，且随着时间推移，这些包囊变大并扩散到全身。随着小鼠的周龄增长（生长超过 20 周），在无毛背部皮肤、颏部和耳后出现轻度局灶性损害。无毛皮肤的组织学显示，毛囊消失但存在小囊和真皮包囊，同时也观察到角质形成细胞的异常增殖和分化，以及炎症反应[8,16]。

3.3 结论

按照前述步骤所建立和鉴定的 $K14\text{-}Cre\text{-}ER^{T2}$小鼠，在用 Tam 低剂量（0.1 mg，5 d)处理后，可以非常有效地在基底角质形成细胞诱导出 Cre-介导的以 LoxP 位点为两侧翼的 DNA 重组。很重要的是，在未给 Tam 的小鼠中未检测到本底重组，这样可以对遗传修饰的出现达到严格的时序控制。$Cre\text{-}ER^{T2}$蛋白重组酶活性的诱导不仅在基底角质形成细胞中有效，在目前检测的所有细胞类型中也都是可行的。在过去数年中，我们建立了许多小鼠品系，可以在不同细胞类型和组织中诱导出受时序控制的体突变（如脂肪细胞、肝细胞、神经系统、雄性生殖细胞）[21,26～28]。一个主要的缺点是能否获得可让转基因选择性表达于给定细胞类型的所有细胞的启动子片段。事实上，用小的启动子区域常观察不到转基因表达，或仅有嵌合性转基因表达。把隔离序列（insulator sequences）或含大基因组启动子的片段（存在于 Bacs 或 Pacs，已知可诱导基因沉默）置于转基因的两侧可能有助于建立有效的 $Cre\text{-}ER^{T2}$转基因小鼠[29～31]。

在其他类型的皮肤细胞中，时序可控的体细胞打靶突变可通过建立在已明确特性的启动子的调控下表达 Cre-ER^{T2} 的转基因小鼠来完成，例如，K1 或 K10 启动子用于基底层上的表皮角质形成细胞[32,33]；多功能蛋白聚糖（versican）启动子用于真皮乳突层细胞[34]；酪氨酸酶启动子用于黑色素细胞[35]。

4 注意事项

（1）舌、唾液腺、眼、胃和食道中的重组与以前介绍过的人 K14 启动子的启动效率相一致[15]。

（2）可选择：用番红精（0.05%）复染 1 min，用蒸馏水清洗三次，每次 30 s。

致　谢：我们感激 P. Soriano 惠赠 RosaR26R 小鼠。我们感谢对建立上述实验方案作出贡献的现在和以前的实验室成员，以及 E. Metzger 、A. Van Es 和照管动物的动物实验室人员、打字的秘书处人员、制作图形的绘图人员。

（黄　炜译　陈　林校）

参考文献

[1] Metzger, D., and Chambon, P. (2001) Site-and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* **24**, 71- 80.

[2] Jonkers, J. and Berns, A. (2002) Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 251—265.

[3] Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J., et al. (1996) Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest.* **98**, 600 603.

[4] Lewandoski, M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 743--755.

[5] Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C. G., Homer, R. J., and Elias, J. A. (2002) Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin Cell Dev. Biol.* **13**, 121—128.

[6] Metzger, D. and Feil, R. (1999) Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 470—476.

[7] Garcia, E. L. and Mills, A. A. (2002) Getting around lethality with inducible Cre-mediated excision. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 151—158.

[8] Metzger, D., Indra, A. K., Li, M., Chapellier, B., Calleja, C., Ghyselinck, N., et al. (2003) Targeted conditional somatic mutagenesis in the mouse: temporally-controlled knock out of retinoid receptors in epidermal keratinocytes. *Meth. Enzymol.* **364**, 379—408.

[9] Fuchs, E. (1997) Keith R. Porter Lecture, 1996. Of mice and men: genetic disorders of the cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **8**, 189—203.

[10] Hardy, M. H. (1992) The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* **8**, 55 -61.

[11] Paus, R. and Cotsarelis, G. (1999) The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* **341**, 491—497.

[12] Mascrez, B., Mark, M., Dierich, A., Ghyselinck, N. B., Kastner, P., and Chambon, P. (1998) The RXRalpha ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development. *Development* **125**, 4691—4707.

[13] Soriano, P. (1999) Generalized LacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* **21**, 70 -71.

[14] Li, M., Chiba, H., Warot, X., Messaddeq, N., Gérard, C., Chambon, P., et al. (2001) RXR-alpha

ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development* **128**, 675—688.

[15] Vassar, R., Rosenberg, M., Ross, S., Tyner, A., and Fuchs, E. (1989) Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1563—1567.

[16] Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., et al. (2000) Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature* **407**, 633—636.

[17] Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

[18] Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., and Behringer, R. (2003) *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

[19] Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10 887—10 890.

[20] Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P., et al. (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14 559—14 563.

[21] Weber, P., Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1777—1783.

[22] Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J. M., Xiao, J. H., Chambon, P., et al. (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER (T) and Cre-ER (T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4324—4327.

[23] Lobe, C. G., Koop, K. E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., and Nagy, A. (1999). Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev. Biol.* **208**, 281—292.

[24] Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A., and Lobe, C. G. (2000) Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* **28**, 147—155.

[25] Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M., et al. (1997) Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1766—1773.

[26] Weber, P., Schuler, M., Gérard, C., Mark, M., Metzger, D., and Chambon, P. (2003) Temporally controlled site-specific mutagenesis in the germ cell lineage of the mouse testis. *Biol. Reprod.* **68**, 553—559.

[27] Imai, T., Jiang, M., Chambon, P., and Metzger, D. (2001) Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 224—228.

[28] Imai, T., Jiang, M., Kastner, P., Chambon, P., and Metzger, D. (2001). Selective ablation of retinoid X receptor alpha in hepatocytes impairs their lifespan and regenerative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4581—4586.

[29] Yang, X. W., Model, P., and Heintz, N. (1997) Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in trangenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* **15**, 859—865.

[30] Bell, A. C., West, A. G., and Felsenfeld, G. (2001) Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science* **291**, 447—450.

[31] Giraldo, P., and Montoliu, L. (2001) Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res.* **10**, 83—103.

[32] Bailleul, B., Surani, M. A., White, S., Barton, S. C., Brown, K., Blessing, M., et al. (1990) Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* **62**, 697—708.

[33] Greenhalgh, D. A., Rothnagel, J. A., Quintanilla, M. I., Orengo, C. C., Gagne, T. A., Bundman,

D. S. , et al. (1993) Induction of epidermal hyperplasia, hyperkeratosis, and papillomas in transgenic mice by a targeted v-Ha-ras oncogene. *Mol. Carcinog.* **7**, 99—110.

[34] Kishimoto, J. , Ehama, R. , Wu, L. , Jiang, S. , Jiang, N. , and Burgeson, R. E. (1999) Selective activation of the versican promoter by epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle develoment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7336—7341.

[35] Porter, S. D. , and Meyer, C. J. (1994) A distal tyrosinase upstream element stimulates gene expression in neural-crest-derived melanocytes of transgenic mice: position-independent and mosaic expression. *Development* **120**, 2103—2111.

第34章　蛋白质相互作用的研究方法

Jin-Jun Meng，Meghan Rojas，Willis Bacon，John T. Stickney，Wallace Ip

摘　要：蛋白质与蛋白质之间的相互作用是众多细胞生命进程的基础。近年来，随着生物化学、细胞生物学与分子生物学的不断相互融合，产生了许多研究蛋白质相互作用的有效方法。这些方法在敏感性、有效性、快速性方面存在许多不同，但正确组合应用这些有效方法已证明是可靠和有效的。本文重点探讨酵母双杂交分析技术，该技术最先由Fields和Song（1989）建立，并由后来的研究者不断完善。另外，我们也简要描述一些用于研究蛋白质之间相互作用的新技术，这些技术是以荧光成像为基础的生物物理学技术，如FRET、FCS和BiFC。这些新技术汇集成了研究蛋白质相互作用的优秀工具。
关键词：双杂交分析；蛋白质相互作用；荧光；成像

1　导言

皮肤是个动态器官，在皮肤的三层结构中，表皮是最具动态特征的。表皮细胞分裂、分化和死亡，这些事件的精巧结合形成身体的保护层，可以有效地防御潮湿、感染和机械性损伤。大量此类事件是由蛋白质之间的相互作用所介导，所以欲全面深入了解皮肤的发育和功能，其关键即在于明了和理解这种相互作用。

表皮中蛋白质-蛋白质的相互作用非常复杂，例如，曾发现在表皮细胞终末分化的最后几个步骤之一，就是在细胞质膜下形成了一层不溶性蛋白质层，叫做细胞包膜。仅这一过程就涉及了20多个蛋白质，接着是一系列受到严格调控的事件[1]。而且这些蛋白质的相互作用并不仅限于两个蛋白质之间的相互作用，常常涉及大的、多蛋白复合体，其中有些蛋白质组合是永久的，而另一些是暂时的。因而研究蛋白质相互作用的相应策略也应当是多种多样、相互有区别的。下面我们将讨论两类研究策略——双杂交分析和基于显微镜的生物物理学分析，并讨论其相对的优点和缺陷。这些研究策略广泛适用于研究大部分蛋白质，但当用于研究细胞骨架蛋白的相互作用时，应牢记这些方法会有某些局限性，若出现这一情况时则需要进一步的鉴定和讨论。我们想要强调的是，研究蛋白质如何相互作用的最成功和可靠的方法是多种研究方法的联合应用，而不是应用单一方法。按照我们的经验来讲，在着手一项新的实验前，实验室没有必要掌握新实验需要的所有专业技术和资源。目前大部分的研究机构均拥有各自的核心设施可以协助和独立完成某些特殊实验，如蛋白质表达或活细胞成像。至于如需用自己实验室尚不熟悉的方法去解决科学问题时，若能与有经验的同事合作同样是出色完成实验的良好方法。

1.1　生物化学方法

生物化学方法目前已非常广泛地应用于研究蛋白质-蛋白质的相互作用。最常见的

生物化学方法是免疫共沉淀、谷胱甘肽巯基转移酶沉降（GST pull down）法、化学交联法和印迹覆盖（overlay）法。在免疫共沉淀法中，一个蛋白质与其特异性抗体结合成为抗原-抗体复合物，再与它的相互作用蛋白配体一起，通过偶联有蛋白 A 或蛋白 G 的琼脂糖珠处理而产生沉淀，然后采用变性凝胶电泳和蛋白质印迹法进行分析。在 GST 沉降法中，靶蛋白作为一个 GST 的融合蛋白在细菌中表达，纯化后与含有假定相互作用蛋白分子的细胞裂解物共孵育，此蛋白质复合物再用谷胱甘肽偶联的小珠进行处理而沉淀。尽管上述两种方法在技术上是不同的，但它们均依赖于一个前提，那就是所研究的蛋白质及相关蛋白复合物对活细胞或组织裂解提取以及实验操作步骤本身均应具足够的稳定性。例如，用免疫共沉淀法进行对蛋白质复合体物的鉴定，只有当经过抗体的处理、充分的冲洗、与偶联有蛋白 A-或蛋白 G-小珠的结合及后来的离心，仍能保持该复合体的完整，方能认为该方法是成功的。然而，化学交联涉及加入一个双功能试剂，它使靶蛋白与其结合的相互作用分子共价交联，随后通过变性凝胶电泳和蛋白质印迹法进行分析，当发现两种蛋白质已经发生交联的时候，这可以作为它们已经发生相互作用的有效证据。市面上有大量的交联试剂可以利用，部分是零长度（zero-length）交联剂，而有些则需一定距离间隔方可发挥作用。大多数试剂在赖氨酸的 e-氨基之间或半胱氨酸残基的巯基之间形成交联。正如下面将要讨论的双杂交试验一样，在做交联实验时，一般我们假定两种蛋白质在一定距离内会发生相互作用。这虽然非常常见，但也应注意并非总是这样。在印迹覆盖实验中，将变性聚丙烯酰胺凝胶电泳胶上所分离的蛋白质转移到硝酸纤维膜或其他类似的膜上，然后加以纯化，再将具有天然潜在相互作用的蛋白质覆盖在膜表面。将印迹膜与针对覆盖蛋白质的抗体一起孵育，可以显示出与覆盖蛋白质发生相互作用的印迹条带。该技术的局限性在于该蛋白质在凝胶上被分离时已经发生变性，有可能不会完全复性，以致未出现相互作用并不能得出结论，任何检测到的假定相互作用必须通过其他手段进一步证实。

这些实验方案的详细论述被广泛传播，容易查找，这里不再一一赘述。读者还可参考 Harlow 和 Lane[2] 或者 Golemis[3] 编写的权威手册。

1.2 双杂交方法

近年来，以双杂交原理为基础的测定方法已经成为研究蛋白质-蛋白质相互作用的基本工具。通常，酵母双杂交的方法利用假定的蛋白质-蛋白质相互作用（结合）来重构一个功能性活性分子，大多是酵母内的转录激活子。该转录激活子的重构能刺激报告基因的表达，其产物可以容易地检测到。报告基因产物的出现可以被当做假定蛋白质-蛋白质相互作用已经发生的指征。双杂交测定法有两个主要系统，即 GAL4 系统[4] 和 lexA 系统[5]。在 GAL4 系统内，转录激活子 GAL4 的 DNA 结合（DB）域和转录激活（TA）域被分别编码在两个载体内。将欲检测其相互作用的蛋白质的互补脱氧核糖核酸（cDNA）亚克隆到两个载体内，因此它们即作为带有 DB 域或 TA 域的融合蛋白而被表达。然后两个载体被转化到酿酒酵母菌株内，该菌株具有一个拷贝的可编码 β-半乳糖苷酶的 *lacZ* 基因，并由 GAL1 启动子所驱动。两个假定蛋白质之间的相互作用将 GAL4 的两个域作为一个功能转录因子进行重组，然后驱动 *lacZ* 报告基因的表达。此后即用一简单的比色法或荧光测定法测定 β-半乳糖苷酶的表达。自 GAL4 双杂交测定系统开

始应用以来[4]，目前已构建出了许多其他系统，其中不少已经成为上市的商品（表 34.1）。现在想要开展一个酵母双杂交测定已非常简单，仅仅需要从供货商处购买载体和试剂，然后按照说明书做亚克隆和转化即可。

表 34.1 部分市售的酵母双杂交载体名单

商品名	载体	诱饵或靶蛋白载体	销售公司与网址	参考文献
HybriZAP 2.1	pAD-GAL4-2.1	靶蛋白	Strategene http://www.stratagene.com/display Product.asp? productId=256	[4]
HybriZAP 2.1	pBD-GAL4-Cam	诱饵蛋白	Strategene http://www.stratagene.com/display Product.asp? productId=256	[4]
Hybrid Hunter	pYESTrp2	靶蛋白	Invitrogen http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/hybrid_man.pdf	[5]
Hybrid Hunter	pHybLex/Zeo	诱饵蛋白	Invitrogen http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/hybrid_man.pdf	[5]
ProQuest	pPC86	靶蛋白	Invitrogen http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10835023.pdf	[9]
ProQuest	pDBLeu	诱饵蛋白	Invitrogen http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10835023.pdf	[9]
MatchMaker 3	pGADT7	靶蛋白	Clontech http://www.clontech.com/products/literature/pdf/brochures/matchmaker.pdf	[4]
MatchMaker 3	pGBKT7	诱饵蛋白	Clontech http://www.clontech.com/products/literature/pdf/brochures/matchmaker.pdf	[4]

2 材料

我们实验室所用的材料和配方见表 34.1 至表 34.3，所需的试剂和化学药品从 Sigma 公司（St. Louis，MO）购买。

表 34.2 培养基、试剂和缓冲液

名　称	组　分
YEPD 液体培养基（500 ml）	5.0 g 酵母提取物 10 g 蛋白胨 300 ml 去离子蒸馏水 高压灭菌 110℃，20 min，冷却到 55℃ 加 50 ml 20%葡萄糖 加水到终体积 500 ml
YEPD 平板培养基（500 ml）	除了需在高压灭菌前添加 7.5 g 颗粒型琼脂，其余与 YEPD 液体培养基相同
MinGal 液体培养基（每 500 ml）	3.5 g 去氨基酸酵母氮碱基 15 ml 甘油 300 ml 去离子蒸馏水 高压灭菌 110℃，20 min，冷却到 55℃ 加 50 ml 氨基酸缺失的混合溶液 加 50 ml 20%半乳糖 加水到终体积 500 ml

续表

名　　称	组　　分
MinGal 平板培养基（500 ml）	3.5 g 去氨基酸酵母氮碱基 7.5 g 颗粒型琼脂 15 ml 甘油 300 ml 去离子蒸馏水 高压灭菌 110℃，20 min，冷却到 55℃ 加 50 ml 氨基酸缺失的混合溶液 加 50 ml 20%半乳糖 加 2.5 ml 20% 葡萄糖 加水到终体积 500 ml
MinGlu 肉汤培养基（每 500 ml）	将 MinGal 液体培养基中的 50 ml 20%半乳糖替换为 50 ml 20%葡萄糖
MinGlu 平板培养基（500 ml）	在 MinGlu 液体培养基中，于高压灭菌前添加 7.5 g 颗粒型琼脂
X-gal 储存液	20 mg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖吡喃糖苷（GIBCOL-BRL）溶解于 *N*，*N*-二甲基甲酰胺溶液中，−20℃ 避光保存
ONPG 工作液	4 mg/ml O-硝基苯-β-D-半乳糖吡喃糖苷（ONPG）（Sigma）溶解于 0.1 mol/L 磷酸氢二钾，pH 7.0
4-MUG 储存液	1 mmol/L 4-甲基伞形酮-β-D-半乳糖吡喃糖苷（4-MUG）溶解于 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7，1 mmol/L $MgCl_2$。4-MUG 应新鲜配制。4MVG 溶解非常缓慢，通常我们将该溶液置于容器，搅拌过夜，或用前至少搅拌 3～4 h
50%聚乙烯乙二醇，M. W. 1500（PEG1500）	4 ml/瓶，无菌，经融合试验检测（Boehringer Mannheim，Germany）。用前加入 1 ml LiOAc 溶液。4℃ 可稳定储存两周。酸洗过的 425～600 μm 玻璃珠（Sigma）
LiOAc-甘油溶液	15%甘油溶于 LiOAc 溶液，0.2 μm 过滤除菌
酵母裂解缓冲液	20 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；50 mmol/L KCl；5 mmol/L $MgCl_2$；0.1 mmol/L EDTA；0.5 mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）；10%（*V/V*）甘油；1 mmol/L 苯甲基磺酰氟化物（PMSF）；2 μmol/L 胃酶抑素 A（pepstatin A）和 0.6 μmol/L 亮抑酶肽（leupeptin）

表 34.3　氨基酸缺失混合物的储备液

氨基酸	储备液/(g/100 ml)	每升培养基中含储备液的毫升数
硫酸腺嘌呤	0.4	5
L-谷氨酸	1.0	20
L-精氨酸	1.0	2
L-天冬氨酸	1.0	20
L-组氨酸	1.0	2
L-亮氨酸	1.0	3
L-异亮氨酸	1.0	3
L-赖氨酸 HCl	1.0	3
L-蛋氨酸	1.0	2
L-苯丙氨酸	1.0	5
L-丝氨酸	8.0	4
L-苏氨酸	4.0	4
L-色氨酸	1.0	2
L-酪氨酸	0.2	15
尿嘧啶	0.2	10
L-缬氨酸	3.0	5

注：配制氨基酸缺失的混合液时，将选择为缺失的一种或多种氨基酸去除后，剩余所有氨基酸储备液按原体积组合，用水替代所缺失氨基酸的体积到终体积。

3 方法

3.1 酵母双杂交的方法

有很多介绍如何使用酵母双杂交测定法的文章，或者是研究两个已知蛋白质之间的相互作用，或者是“挖掘”一个已知蛋白质与另一个感兴趣蛋白质之间的新的相互作用。Bolger[6]的文章和 Golemis 2002 手册[3]中由 Serebriiskii 和 Joung[7]撰写的关于蛋白质-蛋白质相互作用的章节均对酵母双杂交测定法及其改进进行了非常好的讨论。这两篇文章详尽地描述了有关载体、酵母菌株和方法，第二篇文章主要关注 lexA 系统的介绍。我们对基于 GAL4 系统的双杂交方法进行了简短介绍，该方法可以研究两个或三个已知蛋白质之间的相互作用[8]，所使用的载体[9]来自 Nathans 实验室。这些载体的升级版本由 Invitrogen 公司作为他们的 ProQuest 双杂交系统部分已经上市，其网址如下：http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10835023.pdf。尽管我们实验室并未使用该试剂盒，但这一方法的新用户有可能发现更加方便和对用户友好的商品化试剂盒。以上提到的任何文章都是可信赖的，只需详尽地一步步按照说明书的步骤去开展双杂交测定法。在这里，我们将分享我们使用 Nathans 系统的经验，并讨论几个测定 β-半乳糖苷酶活性的方法。除载体构建和用于转化的酵母菌株外，下面提到的大多数方法对双杂交测定法来说一般都是适用的。试剂的配方详见表 34.2 和表 34.3。

3.1.1 载体构建、感受态细菌的制备和转化

采用标准方法克隆感兴趣的 cDNA 到双杂交载体。我们常规测序那些构建的载体以确保 cDNA 插入片段在 DB 或 TA 域框架内，以便表达融合蛋白。当混合来自不同双杂交系统的质粒时，必须很小心，这是非常重要的。尽管 DB 和 TA 域的许多组合体将激活转录，我们必须保证所需要的两个质粒具有不同的选择标志。

3.1.1.1 感受态酵母细胞的制备

我们采用乙酸锂法制备感受态酵母细胞，步骤如下。

(1) 从新鲜生长的酵母培养板内挑取单个菌落，接种到 25 ml 的 YEPD 培养基内，置于 200 r/min 摇动孵箱，28℃培养过夜，直至酵母菌达到生长曲线的对数中期 [A_{600} =0.8～1.0，或 (0.5～1.0)×10^7 个酵母菌/ml]。

(2) 台式离心机以 3000 r/min 低速离心 2 min，沉淀菌体，弃上清。

(3) 用 10 ml LiOAc 溶液重悬细胞，再离心沉淀细胞。重复两次。

(4) 加入 2 ml LiOAc-甘油溶液到最后的沉淀物中，用手轻轻摇晃，以重悬细胞。

(5) 将感受态酵母细胞分装到 1.5 ml Eppendorf (EP) 微量离心管内 (50 μl/管)。感受态细胞可立即用于转化，也可置于－70℃或更低温度的低温冰箱冻存备用。

(6) 缓慢冻存感受态细胞是非常重要的，简便的方法是冻存前在冻存管外面包裹 8～10层纸巾。

3.1.1.2 酵母转化

不论是新鲜制备的或先前冻存（已室温下融化）的感受态细胞均可用作转化[10,11]。

操作步骤如下。

（1）取每一载体 1～2 μl（0.1～0.5 μg/μl DNA）加到 50 μl 感受态细胞里，轻轻混匀，室温孵育 5 min。用每种 DNA 1～3 μg 转化 50～100 μl 的感受态细胞，通常可以在一个 MinGal 培养皿内形成分离良好的 20～100 个菌落。

（2）加入 140 μl PEG1500 溶液，反复颠倒试管 4～5 次，使其彻底混合。

（3）置细胞于 30℃孵箱中至少 45 min，然后轻弹试管混匀，放入 42℃水浴中 5 min，热激细胞。

（4）置于台式离心机中离心，3000 r/min，约 30 s，沉淀细胞。

（5）以 1 ml 无菌蒸馏水清洗细胞两次，用吸管吹打重悬细胞，离心后弃上清。

（6）用 100 μl 无菌蒸馏水重悬细胞。

（7）将转化细胞铺于含选择性培养基的培养板上，颠倒培养板，28℃孵育 3～4 d，让转化细胞生长。

（8）当酵母菌落直径生长达到 1～2 mm 时，取单个菌落接种于 2 ml 补充有适当氨基酸缺失（drop-out）的混合物的 MinGal 培养基。

（9）28～30℃摇荡孵育 48～72 h。至此培养的酵母可用于测定 β-半乳糖苷酶活性。

3.1.2 β-半乳糖苷酶测定

在双杂交研究中 β-半乳糖苷酶是使用最广泛的报告基因。有许多方法可用于测定 β-半乳糖苷酶活性；下面描述的方法为我们实验室所常规使用，每种方法都各有优缺点。注意事项（1）对这三种方法进行了比较。

3.1.2.1 X-gal 染色法

这是一种快速的但只是定性的 β-半乳糖苷酶测定法[12]。这种方法有两个缺点：一是不能获得数据资料；二是当蓝色显色反应微弱时，关于酵母菌落是否呈阳性的判断经常变得比较主观。

（1）让转化的酵母在补充有合适氨基酸缺失的混合物的 MinGal 培养板上生长，28℃孵育 2～3 d。

（2）当菌落直径达到 1～2 mm 时，小心地在培养板表面放置一张高压灭菌的硝酸纤维素膜。

（3）放有膜的培养板于 30℃孵育 30 min。

（4）使用钝头镊，小心将膜从琼脂表面撕下来。菌落面朝上，将膜浸入冰桶的液氮内 5 s，透化处理细胞。

（5）用含 1 mg/ml X-gal 的 2 ml Z 缓冲液浸泡 Whatman 3MM 滤纸后，将滤纸放入 100 mm 的有盖培养皿中。室温下解冻硝酸纤维素膜，菌落面向下置于 3MM 滤纸表面。

（6）盖上培养皿，37℃ 孵育 10～60 min，以显示出蓝色。

3.1.2.2 ONPG 测定法

这种方法是一种定量的比色法，以 O-硝基苯基 β-D-半乳糖吡喃糖苷（ONPG）作为底物[13]，该底物的酶解分裂释放一种亮黄色的反应产物，可以在标准分光光度计下 420 nm 处检测到该产物。

(1) 该方法应该同时做三份样本，将生长于带有适当氨基酸缺失的混合物的 MinGal 培养板上的单个菌落酵母转化株接种于 2 ml 液体培养基中。

(2) 28℃摇荡孵育 2～3 d，直至细胞生长至生长曲线的对数中期（$A_{600}=0.8\sim1.0$）。

(3) 记录 A_{600}，然后吸取 0.1 ml 酵母培养物，置于 1.5 ml 的微量离心管内，加 0.8 ml Z 缓冲液、0.1 ml 氯仿及 50 μl 0.1% 十二烷基硫酸钠，然后涡旋混匀 30 s。

(4) 加 0.15 ml 的 ONPG 测试溶液，涡旋混匀。

(5) 30℃ 孵育 60 min，或直至溶液呈现黄色。

(6) 加 0.3 ml 的 1 mol/L Na_2CO_3 停止反应。

(7) 12 000 r/min 离心，以去除细胞碎片，小心将上清液转移到新管。

(8) 用分光光度计测定 420 nm 处的吸光度。

(9) 采用下面的公式计算 β-半乳糖苷酶活性：

$$\text{活性}(\mathrm{U/min \cdot ml}) = [A_{420}/t \times V \times A_{600}] \times 1000$$

式中，A_{420} 为 420 nm 处的吸光度；A_{600} 为 600 nm 处酵母培养物的吸光度；t 为与 ONPG 孵育的分钟数；V 为测定中所用酵母培养物的容量（ml）。

3.1.2.3 荧光测定法

该测定法以荧光物质 4-甲基伞形酮 β-D-半乳糖吡喃糖苷（4-methylumbelliferyl β-D-galactopyranoside，4-MUG）[14] 为底物。酶法裂解产生一个反应产物，受 360 nm 光激发时，可产生 450 nm 的激发光。在我们的经验中，这是检测 β-半乳糖苷酶活性的最敏感的方法，因此在双杂交转化中，很容易识别弱的相互作用与无相互作用。

(1) 该方法应同时做三份样本，酵母转化物生长于补充有适当氨基酸缺失的混合物的 MinGal 培养板上，从中选取一单个菌落接种到 2 ml 液体培养基。

(2) 28℃摇荡孵育 2～3 d，直至细胞达到生长曲线的对数中期（$A_{600}=0.8\sim1.0$）。

(3) 记录培养物的 A_{600}。

(4) 充分摇荡酵母培养物，然后吸取 0.1 ml，置于 1.5 ml 的微量离心管内。

(5) 12 000 r/min 离心 30 s 沉淀细胞，小心弃去上清液。

(6) 液氮中冰冻酵母细胞 2 min，以增加其通透性；然后室温解冻，或者置于 −20℃或 −70℃冰箱数小时；再加入 3/4 体积的已酸洗过的玻璃珠（425～600 μm），剧烈涡旋振荡。

(7) 加入 350 μl 4-MUG 反应缓冲液（10 mmol/L 磷酸盐，pH 7.5；1 mmol/L $MgCl_2$，0.1% [m/V] 牛血清及 0.1% NaN_3）和 50 μl 1 mmol/L 4-MUG（配制于 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 7.0，1 mmol/L $MgCl_2$ 中）。

(8) 混匀，37℃孵育 60 min。

(9) 加入 400 μl 4-MUG 终止液（0.1 mol/L 甘氨酸，pH 10.3）使反应终止。

(10) 在微量离心机中高速离心约 1 min。

(11) 小心将上清液移至新管，用于读取荧光强度值。

(12) 荧光分光光度计的激发光设置为 360 nm，在发射光 450 nm 处记录每个样本的荧光值。

(13) 将其与 4-MUG 孵育 5 min 后即可测得荧光，并且荧光随着时间延长而稳定增强。加入终止液使反应停止，荧光仍可保持稳定至少 4 h。保存 16 h 后，荧光的总体

变化仍小于10%。

（14）采用下面的公式计算β-半乳糖苷酶的活性：

$$活性(U/ml) = 1.62 \times [F \times M/V \times A_{600}]$$

式中，F为450 nm处的荧光发射光，为任意单位；M为读取数值前样本的稀释因子；V为所检测酵母样本的体积（ml）；A_{600}为600 nm处酵母培养物的吸光度。

3.1.3 对照

在双杂交测定中，包含所有必要的对照是非常重要的。这些测定法有时在技术上具有挑战性，但也存在一些缺陷[见注意事项（2）～（4）]。至少应该包括下列对照。

（1）阳性对照。商品化的双杂交试剂盒中，常包括阳性对照质粒在内，该质粒编码一对已知可相互作用的蛋白质。由其转化而来的阳性报告基因活性可以确知所有试剂均合格，可使用。

（2）双杂交系统质粒中仅插入一个cDNA片段（缺失另一个）的转化。无法检测到报告基因的活性。如果一个带有插入片段和一个空白载体的转化物可以检测到明显的信号，则该cDNA插入片段很可能编码一个可以激活转录的多肽，或者非特异性黏性结合。在这种情况下，换一套不同的双杂交载体可能是最容易的解决方法。另外比较费劲但却是更加全面的解决方法就是用逐渐增加截短cDNA片段以代替全长蛋白cDNA，期望最终可以去除蛋白质的不必要（offending）区域。

（3）交换插入cDNA片段的双杂交载体的转化。对换cDNA插入片段和载体将不会显著更改报告基因的活性。我们已经发现，10%～15%的变更通常是可以接受的。当变更超过这一实际限度时，结果仍然可用，但应谨慎对待，同时应寻求用其他方法验证结果。

用以证实蛋白质阳性相互作用的一个方便而有效的方法就是确定两种融合蛋白确实已经相互结合。这可以通过从已转化酵母中得来的蛋白质提取物进行化学交联的方法来实现，以及通过免疫印记法证明确实存在一个分子大小合适（即两种蛋白质再加DB和TA域的总和）的复合体。免疫共沉淀也是非常好的可以证实蛋白质-蛋白质相互作用的方法，如果可以利用，则应该使用待测蛋白质的抗体。如果无法获得这些抗体，也可购买针对GAL4、LexA和其他系统中DB和TA域的抗体，用于蛋白质印迹实验中。

3.2 细菌及哺乳动物的双杂交系统

细菌的双杂交试验系统在Dove等的文章[18]中做了简要的介绍。Stratagene公司（http:// www.stratagene.com/displayProduct.asp?productId=52）已经把名为BacterioMatch的细菌双杂交试剂盒推向市场。BacterioMatch系统与酵母双杂交系统的研究策略类似，都是诱饵蛋白与靶蛋白相互作用发生后重构了一个功能性转录激活因子。本例子中，感兴趣的两种蛋白质将融合到噬菌体λ的阻遏蛋白λcl（其中含有DNA结合域）或RNA聚合酶的α亚基。大肠杆菌为转化载体。一旦两种蛋白质发生相互作用，λcl可与λ操纵基因结合，并将RNA聚合酶募集到启动子处，激活两个报告基因的转录：一是氨苄青霉素耐药基因（Amp^r），另一是编码β-半乳糖苷酶的*lacZ*。既能在氨苄青霉素的存在下生长，又能表达β-半乳糖苷酶的大肠杆菌，即可证实蛋白质与蛋白质

之间的相互作用。

细菌双杂交系统的主要优点是大肠杆菌的生长远快于酵母，因而整个实验过程较酵母双杂交系统节省大量时间。其判读指标一是定性指标，即大肠杆菌可在氨苄青霉素存在下生长，而另一指标为可定量检测的β-半乳糖苷酶的活性。

读者不应惊奇的是目前已可获得哺乳动物的双杂交系统，该系统由 Stratagene 公司开发上市（http://www.stratagene.com/displayProduct.asp?productId＝509），它利用 CMV 启动子驱动两个载体的表达。诱饵载体编码一个感兴趣蛋白和 GAL4 DNA 结合域之间的融合蛋白，而靶载体则编码融合了的另一感兴趣蛋白和 NF-κB 激活区域之间的融合蛋白[19]。报告基因载体由萤光素酶基因和位于其前的 GAL4 结合位点的 5 个拷贝，以及一个 TATA 序列组成。所有三个质粒共同转入到哺乳动物细胞系，例如，COS、HeLa、中国仓鼠卵巢细胞和 293 细胞都可以转入。两个蛋白质之间的相互作用可携带 NF-κB 激活区域接近萤光素酶基因并激活之，从而产生萤光素酶。萤光素酶的活性可将萤光素氧化成释放萤光的氧化荧光素，然后可从许多公司（如 http://www.Promega.com）购买试剂盒，用发光测量计进行检测。

哺乳动物双杂交系统对已由酵母或细菌双杂交筛选实验中鉴定出的假定蛋白质相互作用进行验证特别有用。由于蛋白质的相互作用发生在哺乳动物细胞，这样就排除了蛋白质在酵母核或细菌中可能发生的人为假象，而且需要翻译后修饰的感兴趣蛋白质之间的相互作用也更有可能发生。

3.3 以成像为基础的研究蛋白质相互作用的实验技术

在此章节，我们简要地讨论几种我们近来已探索过的技术。我们发现在研究蛋白质相互作用中，这些技术对双杂交分析具有非常好的互补作用。这些技术是建立在使用标准宽视野荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜基础上的。以成像为基础的检测法的主要优点是在活细胞环境下进行，其中的一些方法还使我们能够直接“看到”活细胞中的蛋白质相互作用。我们发现后者经常可以提供很受欢迎的空间定位信息，这是在标准的酵母双杂交系统中所欠缺的，我们强烈推荐这两种实验方法联合应用，可以更加深入理解蛋白质相互作用。许多成像分析技术汲取了绿色荧光蛋白技术上最新进展的优点[21,22]，由于篇幅限制，本文仅做简单介绍。每一技术所提供的电子信息网络链接均包含了该技术的详细信息，以及供应试剂和实验方案的公司。

3.3.1 荧光共振能量转移

荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）是 25 年前即被公认的生物物理技术，该技术用于测量大分子间的距离[18]。它是两个荧光染料分子间的相互作用，将供体激发态能量转移到受体的过程，并不发射光子。作为共振能量转移供、受体对，荧光物质需要满足以下条件：①供体的发射光谱必须与受体的激发光谱重叠；②两分子距离必须非常接近。第二点是发生 FRET 的必要条件，因为荧光共振能量转移的效率与分子间分开距离 6 次方的倒数呈正相关[22]。对于通常使用的供、受体对，能够产生 FRET 现象的典型距离为 5～10 nm，超过这个范围，荧光会很快衰减，这就使 FRET 成为一个极其敏感的工具。蛋白质相互作用测量，其敏感性远远大于对

生物大分子大小的测量。

在绿色荧光蛋白（GFP）技术建立之前，FRET首先被应用于生物化学领域，用化学方法给蛋白质标记上荧光探针，使用荧光分光光度计测定溶液中的荧光强度[23]。GFP及其衍生物的应用促进了成像技术的发展，进而产生了目前广泛应用的FRET显微镜成像技术。常规方法构建的表达载体可以编码蓝绿色荧光蛋白（cyan fluorescentprotein，CFP）和黄色荧光蛋白（yellow fluorescent protein，YFP）的融合蛋白，它们的发射光谱与激发光谱重叠。另外，GFP融合蛋白中的GFP部分能作为荧光染料Cy3的激发光供体，Cy3可以化学结合到一个有假定蛋白相互作用的搭档分子。前者是典型的用于测定两种蛋白质之间是否具有相互作用的方法，即编码CFP和YFP融合蛋白质的两个质粒共转到培养的细胞，如能观察到FRET现象，则提示两测试蛋白之间具有相互作用。而后者GFP和Cy3的供体-受体对则适用于分析给定蛋白质的翻译后修饰研究[24]。典型的例子是将待测蛋白与GFP融合，并转入培养细胞。用Cy3标记对蛋白质的修饰状态具有特异性的抗体，例如，能特异性识别给定信号蛋白的酪氨酸磷酸化位点的抗体，将它们或是显微注射入活细胞，或是标记固定的细胞，然后进行FRET测定。

FRET可以导致受体荧光发射光增强而供体荧光发射减弱。这两项参数的任何一个都能测量，但其中的任何一项都有其各自的不足[25]。直接测量受体增强的发射光时会出现误差，这是由于供体和受体激发光谱间存在不可避免的重叠，受体不仅仅被供体的发射光激发，同时较小程度地可直接被供体的激发光激发，这一小部分的直接激发应当从受体发射光总增量中减去，这就需要记录另外的图像和校正背景。欲测量由FRET造成的供体发射光猝灭也只能间接进行，这是由于供体和受体均同在一个细胞中，因而不可能测定供体发射光的FRET前水平。为了测量供体发射荧光猝灭，可用光漂白处理破坏细胞一定区域内的受体荧光染料分子，从而使得该区域不能接受供体的发射光激发。当供体被激发后，由于光漂白区缺乏功能性受体，其发射光水平应高于其周围的非光漂白区，这种依赖于供体激发光的漂白区供体发射光增强可以作为阳性FRET。

FRET的检测可以在具有标准的宽视野的荧光显微镜或激光共聚焦显微镜上进行，目前在研究机构中已广泛配置这些仪器。一套典型的宽视野荧光显微镜由带荧光激发光源（epifluorescence illumination）的高质量研究用显微镜、高量子效率的电荷耦合器件（CCD）照相机（如Hamamatsu公司的Orca ER）、图像处理软件（如Universal Imaging's Metamorph）及配套的滤光片组成。电动快门也对实验很有帮助。就FRET而言，宽视野荧光显微镜的优点是其较使用激光共聚焦显微镜更为简单，但它有两个缺点：第一是来源于焦点平面上下的发射信号可以减弱最后的图像；第二是不能利用感兴趣区域的特征对细胞的小范围进行光漂白，而共聚焦显微镜具有这种功能，这种宽视野设备只能对整个视野进行光漂白。FRET采用共聚焦显微镜可以缓解上述两个问题，但是在供体/受体对的选择上就受到一定程度的限制，那是因为可以用于供体激发的光波长受到该设备可提供的激光发射波段的限制。

上述是对FRET的最基础知识的简要概括介绍。关于FRET已有了许多优秀的综述和书籍[24~27]，鼓励读者从中查阅其理论论述及更加详细的实验技术方案。特别推荐由Periasamy[25]出版的书籍，它是拟应用成像技术研究蛋白质相互作用的实验室的必备

用书和优秀资源。

3.3.2 双分子荧光互补技术

双分子荧光互补技术（bimolecular fluorescence complementation，BiFC）是用于检测蛋白质相互作用的简单而有效的新方法。该方法基于双杂交原理，在荧光显微镜方法下进行操作和观察。该方法利用 GFP 衍生物黄色荧光蛋白（YFP）的优点，将 YFP 分割成两个不具荧光活性的分子片段，再分别与目标蛋白连接，如果两个目标蛋白有相互作用而靠近，使得两个不具荧光活性的分子片段相互再结合，重新形成了具荧光活性的基团而发出荧光。

与前述的双杂交分析类似，BiFC 也需要构建两个载体，其中一个编码 YFP N 端1～154 个残基和一个目标蛋白的融合蛋白，另一个编码了 YFP C 端 155～238 个残基和另一个目标蛋白的融合蛋白。将这两个融合蛋白共同转入细胞，当两目标蛋白产生相互作用后，YFP 则在功能上重新构建而发出荧光。所需要的阴性对照由去掉一个或两个载体内的目标蛋白 cDNA 插入片段组成。在最初的研究中，将即早基因 *Fos* 和 *Jun* 基因的碱性亮氨酸拉链（basic region leuciene zipper，bZIP）结构域分别融合到 YFP 的两个分裂片段，由于 *Fos* 和 *Jun* 的 bZIP 区具有明确的相互作用，故可作为阳性对照。

近来，由同一研究者[29]从原来报道改进出更加有效的实验方法，报告指出 GFP 本身及其变体 CFP 和 BFP，都可用类似的方式割裂而产生两个非荧光片段，当它们再组合的时候又能产生荧光。此外，当来自不同荧光蛋白的裂解片段组合时，所形成杂交分子的荧光同它们的母体荧光相比具有不同的光谱特性。可见，不同荧光蛋白片段的融合蛋白共同转入同一细胞可以同时观察多重的相互作用，而且根据产生的蛋白质复合物的不同颜色可以评估细胞对多种蛋白质之间相互作用的选择性。

编码两个 YFP 片段的载体 pBiFC-YN155 和 pBiFC-YC155，以及阳性对照载体可以通过物品转移协议从原作者 Dr. Changdeng Hu（cdhu@umich. edu）那里获得。就我们的经验而言，BiFC 是简单易行的实验技术，只要能够转染培养的哺乳动物细胞，就可以在该细胞内对感兴趣的蛋白质进行其相互作用的研究。此技术所需的实验设备很简单，任何配备适当滤光片的研究用荧光显微镜就可以满足实验，得到的相互作用实验数据的解读也较 FRET 相对简单。使用标准的 FITC 检测用的滤光片，可以很容易测得 YEP 的发射荧光，当然也可使用专为 YFP 设计的滤光片组，Omega Optical 公司（http://www. omegafilters. com）和 Chroma Technology 公司（http://www. chroma. com）均可提供相应的产品。

3.3.3 荧光相关光谱学

荧光相关光谱学（fluorescence correlation spectroscopy，FCS）是以显微镜为基础的用于研究蛋白质相互作用的强有力的技术，但目前配置尚不普遍[30,31]。对有幸接触到此设备的人来说，测定蛋白质与蛋白质间的相互作用非常快速（仅需几分钟），空间分辨率极高（通常能达到约 0.25×10^{-15} L），且可以在活细胞中进行实验。正如 FCS 名字所描述的，FCS 是一个光谱学技术，尽管 FCS 在特制的共聚焦显微镜（如 Zeiss ConfoCor2）上进行研究，读出的实验结果却并不是图像而是一个相关曲线。对于这项

功能强大的技术有一篇非常好的综述，可从下列网址找到 http://www.zeiss.de/C12567BE0045ACF1/allBySubject/6736A9B858525267C12569B4002FD671。

FCS 测量在限定体积元素范围内受到聚焦激光束（共焦容量）照射的荧光标记分子的随机扩散，并报告荧光变动相关函数，所提供的粒子扩散速率信息又依赖于粒子的质量。当两种粒子相互作用时它们的质量相互累加，这一点可被相关函数的变化反映出来。分子聚集体的扩散时间可从相关函数得出，从而计算出它的分子大小。此外，若用两种不同的荧光染料标记这两种粒子，就可以在两个分开的通道中记录到它们的相关函数，进而确定二者的交互相关。

事实上，可用编码融合蛋白和两种不同荧光蛋白（如 GFP 和 BFP）的单独载体转染培养的细胞，然后直接用 ConfoCor2 分析细胞，也可以用细胞溶解物来进行分析。目前国内只有很少的地方能够做 FCS 分析，然而这种情况在不断改善。该技术功能强大、通用性强，值得和拥有该技术相关设备的研究人员进行合作研究。

3.4 结束语

尽管本章的许多内容并未特别关注与表皮生物学相关的问题，但可以体会到我们讨论的这些相关技术非常适合研究那些特定问题，而无需做重大修改。对蛋白质-蛋白质相互作用感兴趣的表皮生物学家而言，这是非常令人兴奋的时刻。分子生物学、基因组学、蛋白质组学、生物信息学及影像技术学为研究和鉴定蛋白质相互作用和相互作用的网络均提供了大量的检测技术和方法。我们使用该技术的有限实践经验表明，不同的测定方法之间可以很好地实现相互验证和补充相互之间的不足，且这种相互补充的力量是巨大的。我们盼望着其他同仁们可以充分利用这些机遇。

4 注意事项

（1）三种测定法的比较。X-gal（复制平板培养）法充其量是测定 β-半乳糖苷酶活性的半定量方法，涉及主观性因素。ONPG 比色法可以定量，检测极限约为 1 ng 或1×10^9个分子。以 4-MUG 作为底物的荧光测定法比 ONPG 比色法灵敏 1000 倍，可以检测 1 pg（原文为 fg，译者注）或 1×10^6 分子。尽管 X-gal 法所测结果并不总是与荧光测定法结果一致，但我们已经发现下面提供的相关关系大多数情况下是有根据的。

X-gal 显色测定	荧光测定法（任意单位）
白色	<500
非常浅蓝色	500
浅蓝色	1000～3000
蓝色	3000～7000
深蓝色	>7000

双杂交系统对于比较蛋白质-蛋白质之间相互作用的强度有效性如何呢？Estojak 等[15]在酵母双杂交系统中测定了已知速率常数的相互作用，并且比较了几个报告基因的反应线性度。他们的结论是由定量报告基因测定法判定的蛋白质-蛋白质相互作用的

强度，一般与其体外测定的结果相关，所以可以接受比较相对强度的结果。然而并没有单个报告基因的基因表达量能线性反映体外测定的亲和力，所以相互作用强大的绝对值并没有多大意义。我们自己的经验也与这些结论相一致。我们已经能够精确比较一些蛋白质之间相互作用的相对强度，例如，蛋白质 X 和蛋白质 Y 的一系列缺失型突变体之间的相互作用，但如果延伸到比较蛋白质 X 和第三个不相关蛋白质 Z 之间的相互作用，并不总是有意义。

（2）GAL4 双杂交系统确实有一些局限性。首先，由于它依赖于 GAL4 的转录激活，因此如果一个感兴趣蛋白质本身就是转录激活子，那么就不能使用该系统（这个限制对 LexA 系统同样适用）。解决这一问题的办法之一，就是构建的多个载体能够编码逐步增大截短的诱饵蛋白，以及重复进行检测直至寻找到不再发生自身激活的编码截短诱饵蛋白的载体。这通常是可行的，但相当耗时费力，值得一提的实例就是一种叫做盘状球蛋白的吸附蛋白。另一个解决方案就是使用不依赖转录激活的双杂交系统，Stratagene 已将这样一个系统推向市场，称为 Cytotrap（http://www.stratagene.com/displayProduct.asp? Product Id=255）。在这个系统里，将一个 cDNA 亚克隆到 pMyr 发生融合，可为所表达的蛋白质提供十四烷基化（myristylation）的信号，以便能够定位到质膜的内侧面。另一个载体 pSos 编码一个融合蛋白，它由另外一个感兴趣蛋白和 Sos（GDP-GTP 交换因子）组成。感兴趣蛋白之间的相互作用可把 Sos 带到细胞膜，在此可以激活 Ras 信号途径和促进细胞生长[16]。酵母宿主是一个在 *cdc*25 基因座部位携带一个温度敏感型突变的菌种（酵母 Sos 同系物），它可在 25℃但不在 37℃生长。通过 Sos 挽救 Ras 路径可以恢复其在 37℃的生长能力，从而可定性检测蛋白质-蛋白质的相互作用。

（3）酵母双杂交系统的另外一个常见的局限性就是蛋白质-蛋白质之间相互作用发生在核内。经常需要考虑的问题就是，对于蛋白质-蛋白质相互作用而言，核内的环境是否等同于细胞质的环境，Cytotrap 提供了一个探索该问题的手段。我们采用细胞骨架-膜连接蛋白的埃兹蛋白-根蛋白-膜突蛋白（ezrin-radixin-moesin）家族二聚体形成模型系统比较了 GAL4 系统和 Cytotrap，并发现这两个系统可以较密切地相互验证[17]，有一个例外就是用免疫共沉淀和 Cytotrap 检测发现 merlin 分子的两个亚型可与埃兹蛋白相互作用，但采用 GAL4 检测仅有 merlin 的亚型 II 与埃兹蛋白有相互作用。由于蛋白质-蛋白质相互作用发生在核内，所以我们不知道通过酵母双杂交检测到的假阳性的特定例子，然而，我们应该小心地进一步采取相关方法给予验证。

（4）酵母双杂交测定的第三个局限性在于需要翻译后修饰的蛋白质-蛋白质相互作用，例如，由于那些特殊类型的修饰在酵母内可能不存在，或者可能受到的调节不同，因而未发生磷酸化（这个局限性同样出现在细菌双杂交系统）。若是采用像 Cytotrap 这样的双杂交系统，由于其蛋白质-蛋白质相互作用发生在胞质，因此虽然不能确保，但能够提高发生蛋白质修饰的可能性。在这些情况下，采用其他方法进行确证是唯一的慎重选择，或者采用免疫共沉淀，或者采用哺乳动物双杂交系统均可成为进行这类确证的良好选择。

（党永明 译　黄跃生 校）

参考文献

[1] Steinert, P. M. (2000) The complexity and redundancy of epithelial barrier function. *J. Cell Biol.* **151**, F5—F7.

[2] Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[3] Golemis, E. (2002) *Protein-Protein Interactions. A Molecular Cloning Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[4] Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245—246.

[5] Gyuris, J., Golemis, E. A., Chertkov, H., and Brent, R. (1993) Cdi1, a human G_1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**, 791—803.

[6] Bolger, G. B. (1998) Molecular genetic approaches I: Two-hybrid systems, in *Methods in Molecular Biology* (Clegg, R. A., ed.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 101—131.

[7] Serebriiskii, I. and Joung, J. K. (2002) Yeast and bacterial two-hybrid selection systems for studying protein-protein interactions, in *Protein-Protein Interactions. A Molecular Cloning Manual* (Golemis, E., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[8] Meng, J. J. and Ip, W. (2001) A yeast two-hybrid approach for probing cytoskeletal protein interactions, in *Methods in Molecular Biology, Vol. 161: Cytoskeleton Methods and Protocols* (Gavin, R. H., ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ.

[9] Chevray, P. M. and Nathans, D. (1992) Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5789—5793.

[10] Hill, J., Donald, K. A., and Griffiths, D. E. (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5791.

[11] Gietz, R. D. and Schiestl, R. H. (1991) Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* **7**, 253—263.

[12] Breeden, L. and Nasmyth, K. (1985) Regulation of the yeast HO gene. Cold Spring Harbor *Symp.* Quant. Biol. **50**, 643—650.

[13] Yocum, R. R., Hansley, S., West, R., and Ptashne, M. (1984) Use of LacZ fusions to delimit regulatory domains of the inducible divergent GAL1-GAL10 promoter in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell Biol.* **4**, 1985—1998.

[14] Meng, J. J., Khan, S. A., and Ip, W. (1996) Intermediate filament protein domain interactions as revealed by two-hybrid screens. *J. Biol. Chem.* **271**, 1599—1604.

[15] Estojak, J., Brent, R., and Golemis, E. A. (1995) Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5820—5829.

[16] Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., Al-Alawi, N., Schlessinger, J., and Karin, M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* **78**, 949—961.

[17] Meng, J. J., Lowrie, D. J., Jr., Sun, H., Dorsey, E., Pelton, P. D., Bashour, A. M., et al. (2000) Interactions between two isoforms of the NF2 tumor suppressor protein, merlin, and between merlin and ezrin, suggests modulation of ERM proteins by merlin. *J. Neurosci. Res.* **62**, 491—502.

[18] Dove, S. L., Joung, J. K., and Hochschild, A. (1997) Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**, 627—630.

[19] Dang, C. V., Barrett, J., Villa-Garcia, M., Resar, L. M., Kato, G. J., and Fearon, E. R. (1991) Intracellular leucine zipper interactions suggest c-Myc hetero-oligomerization. *Mol. Cell Biol.* **11**, 954—962.

[20] Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* **6**, 178—182.

[21] Hanson, M. R. and Kohler, R. H. (2001) GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 529—539.

[22] Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819—846.

[23] dos Remedios, C. G., Miki, M., and Barden, J. A. (1987) Fluorescence resonance energy transfer measurements of distances in actin and myosin: a critical evaluation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **8**, 97—117.

[24] Verveer, P. J., Harpur, A. G., and Bastiaens, P. I. H. (2002) Imaging protein interactions by FRET microscopy, in Protein-Protein Interactions. *A Molecular Cloning Manual.* (Golemis, E., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[25] Periasamy, A. (2001) *Methods in Cellular Imaging*. Oxford Univ. Press, New York.

[26] Day, R. N. (1998) Visualization of Pit-1 transcription factor interactions in the living cell nucleus by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Mol. Endocrinol.* **12**, 1410—1419.

[27] Kenworthy, A. K., Petranova, N., and Edidin, M. (2000) High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1645—1655.

[28] Hu, C. D., Chinenov, Y., and Kerppola, T. K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**, 789—798.

[29] Hu, C. D. and Kerppola, T. K. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotech.* **21**, 539—545.

[30] Elson, E. L. (2001) Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells. *Traffic* **2**, 789—796.

[31] Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E., and Kenworthy, A. (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 444—466.

第35章　识别皮肤角质形成细胞的重组噬菌体展示抗体的分离

Kim Bak Jensen，Peter Kristensen

摘　要：科学研究工具的进步极大地推动了我们在分子水平对生命的理解。这些进步不仅包括新技术的引入，如 PCR，还包括对现行方法的改善，如提高灵敏度。采用噬菌体展示在体外获得抗体就是其中之一，这项技术在 10 年前出现之后就不断得到改良。现在噬菌体展示抗体选择技术已成为蛋白质组学研究中的常用技术，可用于鉴别细胞表面抗原的差异性表达等。本文所述的方法能快速分离识别皮肤角质形成细胞的一组重组抗体。该方法利用一种对蛋白酶敏感的辅助噬菌体的特性，经过一轮简单的筛选，就可以方便地通过亲和力结合实验获得重组抗体。由于降低了试验噪声，从而可以确保所获抗体的高度多样性。

关键词：表皮角质形成细胞；单链抗体可变区基因片段（scFv）；噬菌体展示；辅助噬菌体；重组抗体；蛋白质组学

1　导言

近年来，有关人类基因组的认识在 DNA 和 RNA 水平都取得了巨大的进步。但我们仍然必须面对如何将这些基因信息与其对应的蛋白质功能相联系的挑战。为了解有关转录后修饰和蛋白质表达水平的信息，抗体是必不可缺的分析工具。传统的抗体制备系通过免疫动物获得[1,2]，但由于 Greg Winter 博士课题组的开拓性工作，现在在体外可以用噬菌体展示技术来取代传统的抗体制备方法。该方法基于性鞭毛阳性的丝状噬菌体，其基因 III 编码的蛋白质具有感染大肠杆菌的能力，同时能够融合外源基因，这样可以将融合蛋白展示在噬菌体颗粒的表面。更重要的是，融合蛋白作为噬菌体颗粒的一个组成部分，与包裹在噬菌体内的对应基因联系在一起。这样可以利用所要求的特性如亲和力，为特定靶标筛选出噬菌体展示出的基因产物。其对应的基因编码片段还可以在纯化的噬菌体感染大肠杆菌后采用 PCR 进行分析。噬菌体展示抗体库和免疫动物所获得的抗体库一样，也是由重链和轻链组成。与传统方法相比，噬菌体展示技术获得单克隆抗体更迅速、费用更低，所需靶抗原的量也大大减少。本文所述的实验方案是基于噬菌体展示抗体技术的最近进展，首先，减少噬菌体颗粒非特异结合的背景噪声；其次，靠亲和力结合的抗体在一轮简单筛选之后就被分离，这样可以确保所得抗体的高度多样性[3]。因此，噬菌体抗体技术成为功能基因组学研究中的一种高通量筛选工具。

2 材料

2.1 抗体库

（1）Griffin 抗体展示库［英国剑桥 MRC；见注意事项（1）］；Tomlinson 抗体展示库[4]［英国剑桥 MRC；见注意事项（2）］；ETH2 抗体展示库[5]［瑞士苏黎世 ETH；见注意事项（3）］。依据上述抗体库一并馈赠的实验手册准备抗体库。

（2）蛋白酶敏感的辅助噬菌体 KM13[6]（随英国剑桥 MRC 的抗体库一起提供）。

（3）TG-1 菌株（K12 supE hsdD5Δ（lac-proAB） thi F′｛traD36 pro AB^+ $lacI^q$ lacZΔ｝）随英国剑桥 MRC 的抗体库一起提供，用于扩增噬菌体颗粒。

（4）从皮肤活检获取表皮角质形成细胞，采用传统的培养法进行培养[7]。

（5）角质形成细胞培养液，其中加有 EGF 和垂体提取物（Gibco；cat. no. 17005-042）及庆大霉素（Sigma Aldrich；cat. no. G 8648，5 μg/ml）。

（6）细菌培养基 2× TY：16 g/L 酪蛋白胨（Merck；cat. no. 1. 07213）、10 g/L 酵母提取物（Merck；cat. no. 1. 03753）和 5 g/L NaCl。

（7）细菌 TYE 琼脂平板：8 g/L 酪蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，5 g/L NaCl，15 g/L 琼脂（Life Technologies；cat. no. 80814943-2），高压灭菌后加 100 μg/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖。

（8）细菌最低（minimal）琼脂平板：配 15 g/L 琼脂 800 ml，高压灭菌，然后加入 200 ml 5× M9 培养基（30 g/L Na_2HPO_4，15 g/L KH_2PO_4，5 g/L NH_4Cl，2. 5 g/L NaCl），1 ml 1 mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，10 ml 20% 葡萄糖，0. 1 ml 0. 5%维生素 B_1（盐酸硫胺；Sigma Aldrich；cat. no. T4625）。

（9）20% *m/V* 葡萄糖，用双蒸水配制，高压消毒备用。

（10）100 mg/ml 氨苄青霉素（1∶1000 储存液）：用双蒸水配制，0. 45 μm 一次性滤器过滤除菌备用。

（11）25 mg/ml 卡那霉素（1∶1000 储存液）：用双蒸水配制，0. 45 μm 一次性滤器过滤除菌备用。

（12）50% 甘油，用双蒸水配制，高压消毒备用。

（13）10 L PBS：58. 4 g NaCl，44. 5 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$，35. 1 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$（pH 6. 8），100 mmol/L NaCl，50 mmol/L NaH_2PO_4/Na_2HPO_4。

（14）添加脱脂奶粉的 PBS（MPBS）。

（15）胰蛋白酶缓冲液：50 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L $CaCl_2$，pH 7. 4，添加胰蛋白酶，其浓度为 10 mg/mL（Sigma Aldrich；cat. no. T 1426）。

（16）6 孔组织培养板。

2.2 筛选

（1）96 孔组织培养板。

（2）96 孔微量细菌培养皿。

（3）HRP 标记的小鼠抗 M13 抗体（Amersham-Pharmacia；cat. no. 27-9421-01）。

(4) 50 mmol/L $NaHCO_3$，pH 9.6。

(5) 鼠抗 Myc 标签抗体：鼠源单克隆抗体，9E10，可以从欧洲组织培养收藏中心(European tissue and culture collection) 获得，也可以从 Sigma Aldrich 购买已纯化的抗体 (cat. no. M4439)。

(6) HRP 标记的兔抗小鼠抗体 (DAKO; Denmark; cat. no. P0447)。

(7) 邻苯二胺 (OPD) 二盐酸片剂 2 mg，用于 ELISA 显色 (DAKO，Denmark; cat. no. S2045)。

(8) 1 mol/L H_2SO_4。

(9) 35% H_2O_2。

(10) *Taq* DNA 聚合酶 (Invitrogen; cat. no. 10342-012)。

(11) dNTP (Promega)。

(12) 引物。Rev：5′-AAACAGCTATGACCATG-3′；M13back：5′-CAAAACCT-CATACAGAAAATTCA-3′。

2.3 抗体的应用

(1) 限制性内切核酸酶 *Bst*NI、*Nco*I 和 *Not*I (New England Biolabs)。

(2) T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs)。

(3) 表达质粒 pKBJ3 (Peter Kristensen，Department of Molecular Biology，University of Aarhus)。

(4) Ni-NTA 珠 (Qiagen™; cat. no. 30410)。

(5) 8 孔玻璃载玻片 (Nunc，Roskilde，Denmark; cat. no. 154941)。

(6) PVDF 蛋白质印迹膜 (Millipore; cat. no. IPVH 000 10)。

(7) 链亲和素包被的 M-280 Dynabeads® 磁珠 (Dynal®，Norway; cat. no. 112.05)。

(8) 用于回收 Dynabeads® 磁珠的 Dynal MPC®-S 磁力架 (Dynal®，Norway; cat. no. 120.20)。

(9) 增强化学发光 (ECL) 蛋白生物素化试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech; cat. no. RPN2202)。

(10) [S^{35}] Redivue 细胞标记复合物 (Amersham Pharmacia Biotech; cat. no. AGQ0080)。

(11) 磷光 (phospor) 图像仪或放射自显影胶片。

(12) 用于间接免疫荧光研究的异硫氰酸荧光素标记的亲和素 (Extravidin™) (Sigma Aldrich; cat. no. E2761)。

3 方法

3.1 噬菌体展示抗体库的筛选 (图 35.1)

本节叙述结合到复杂抗原混合物的噬菌体展示抗体的初步筛选，例如，细胞膜表面

表达的各种抗原和细胞分泌的可以整合到胞外基质中的多种蛋白质。而且，将这些技术应用于纯化的靶蛋白时，只要细微调整操作流程就可以筛选出识别特定蛋白的抗体［见注意事项（4)］。上述方法需要使用培养的细胞，如表皮角质形成细胞。

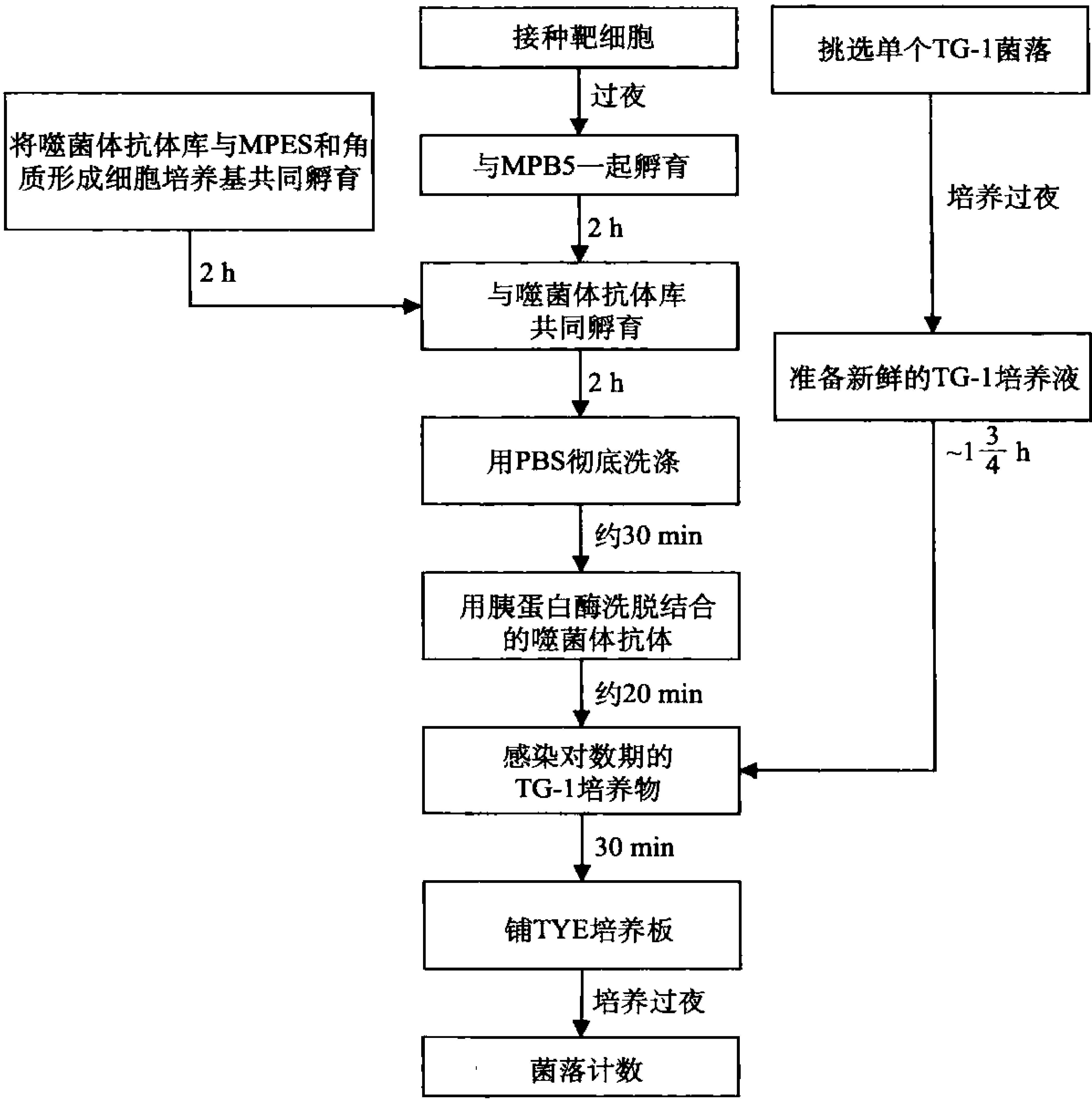


图 35.1　筛选针对表皮角质形成细胞的噬菌体展示抗体的流程图

3.1.1　筛选过程

（1）筛选前一天，从细菌最低培养皿挑取 TG-1 菌株的单个菌落接种在 2×TY 培养液 20 ml 中，37℃搅动孵育过夜，次日取出，4℃储存备用。

（2）筛选前一天，表皮角质形成细胞以大约 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔培养板，用角质形成细胞培养基孵育过夜。

（3）筛选当天，取出步骤（2）中培养过夜的表皮角质形成细胞，用 PBS 清洗两次，加入新鲜配制的 2%脱脂奶粉溶液（MPBS)，室温孵育 2 h。

（4）同时取 0.5～1.0 ml 噬菌体展示抗体库（大约 10^{13} 个菌落形成单位）与同体积角质形成细胞培养液及含有 2%终浓度脱脂奶粉的 PBS 混合，最终总体积为 3 ml，室温孵育 2 h。

（5）用 PBS 清洗步骤（3）中的角质形成细胞。

（6）将步骤（4）中预先封阻过的噬菌体展示抗体库加于步骤（5）中预先封阻过的培养孔中，室温孵育 2 h。

(7) 取 500 μl 过夜培养的 TG-1 菌液，接种于 50 ml 2× TY 培养液中，37℃振荡培养约 1 h 45 min，至 $OD_{600\ nm}$约为 0.5。

(8) 移除步骤 (6) 的孵育液，用 PBS 清洗培养孔 6 次，每次 5 min。

(9) 准备胰蛋白酶液（用 50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4；1 mmol/L $CaCl_2$ 配制成 10 mg/ml)，并用胰蛋白酶缓冲液作 10 倍稀释，以供洗脱结合的噬菌体展示抗体之用。

(10) 在步骤 (8) 中洗好的培养孔中加入 500 μl 已稀释的胰蛋白酶液，室温孵育 20 min。胰蛋白酶可以切断抗体和噬菌体衣壳蛋白之间的连接，从而洗脱出特异性结合的噬菌体 [见注意事项 (5)]。

(11) 取步骤 (10) 中洗脱的噬菌体 250 μl，感染 1.75 ml 新鲜培养（OD_{600} 约为 0.5）的菌株 TG-1，37℃孵育 30 min。剩余的 250 ml 噬菌体洗脱液作为备份－20℃冻存。

(12) 取 200 μl 已感染噬菌体的细菌培养液，加入 1.8 ml 2× TY 培养液稀释；然后再取 200 μl 稀释细菌培养液，依次按 1∶10 稀释，重复三次 [见注意事项 (6)]。将总共 4 个稀释梯度的菌液分别涂布于含有 100 μg/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖的 TYE 培养板（直径 13.5 cm)。

(13) 待平板干后，30℃孵育过夜。

(14) 计数稀释梯度菌液中的菌落数，计算出回收噬菌体的大致数量。如果数量低于 100 或者大于 10^6，表明筛选的过程可能有问题，需要重新筛选。

3.2 筛选回收的噬菌体展示抗体（图 35.2)

要获得对靶蛋白有亲和力的单克隆抗体，噬菌体展示抗体应该以单个克隆的形式表达。初筛获得的抗体可能与筛选体系中的各种相关成分有反应，如角质形成细胞、脱脂奶粉、塑料培养皿及角质形成细胞培养液等。为了获得最大的抗体多样性，第一轮筛选后还需要进一步筛选。对第一次筛选的阳性抗体克隆进行第二次筛选，可以确保阳性抗体识别靶蛋白的表位 [见注意事项 (7)]。

3.2.1 获得单克隆噬菌体抗体

(1) 菌落计数后，取 96 孔微量培养板，每孔加 150 μl 2× TY（含终浓度为 100 μg/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖)，再用消毒牙签挑取单菌落接种于孔中，便制作出“主培养板”。

(2) 将微量培养板置于湿盒（如带有湿化纸巾的塑料盒）中，37℃孵育振荡过夜 [见注意事项 (8)]。

(3) 取一块新的 96 孔微量培养板，每孔加 150 μl 2× TY（含终浓度为 100 μg/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖)，做好对应的标记，从旧的微量培养板中每孔取 50 μl 复制步骤 (2) 中的微量培养板；或用 96 针的微量培养板接种器 [见注意事项 (9)] 复制新的主培养板。

(4) 在步骤 (3) 的主培养板中，每孔加消毒好的 50 μl 50% (V/V) 甘油，－80℃冻存备份。

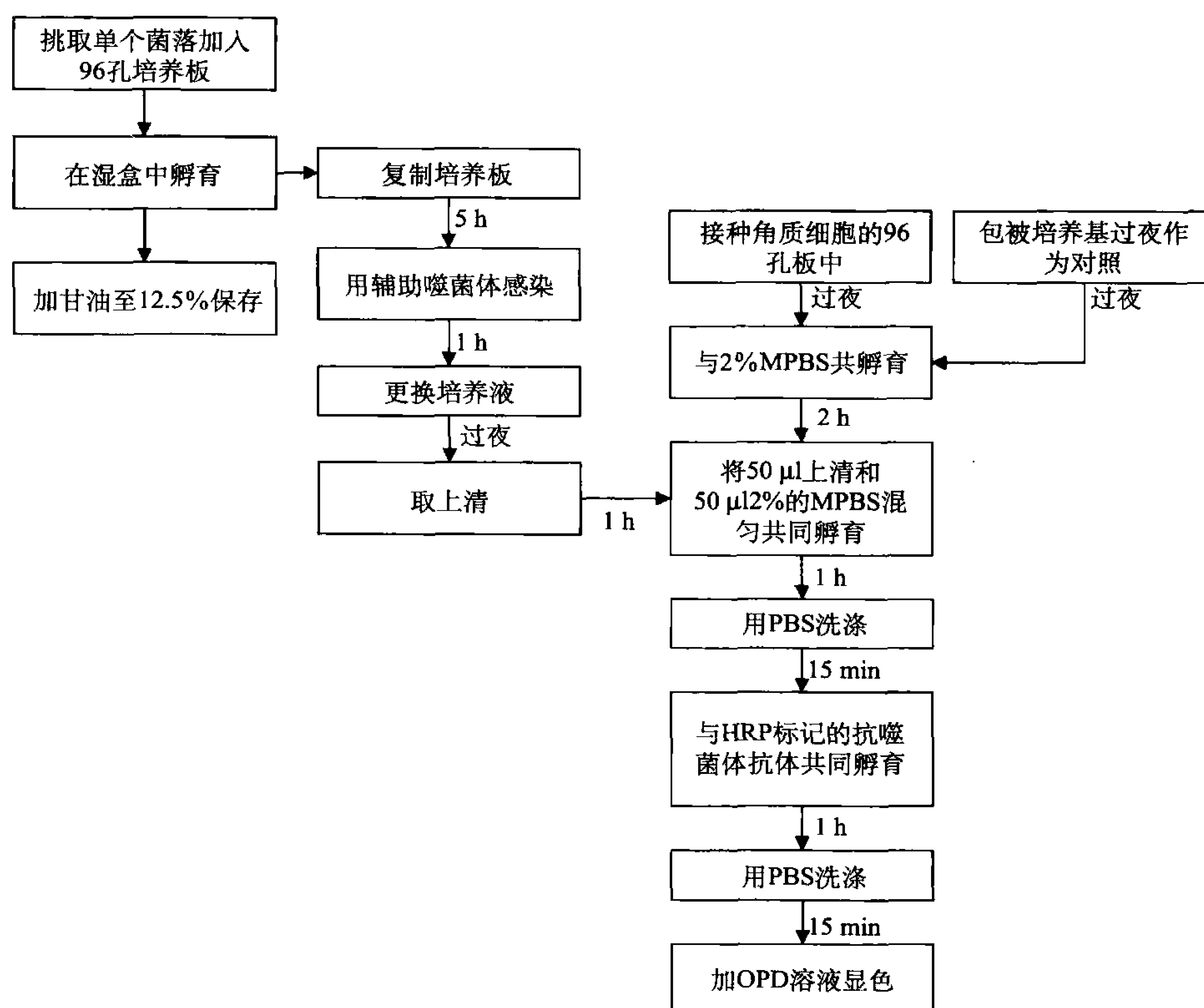


图 35.2 针对角质形成细胞筛选出的单克隆抗体的鉴定步骤流程图

(5) 将新的主培养板置于 37℃湿盒中振荡孵育 5 h。

(6) 每孔加 25 μl 2× TY，其中辅助噬菌体 KM13 为 10^9 个空斑形成单位 [感染复数为 20；见注意事项 (10)]，37℃静置孵育 1 h。在加入辅助噬菌体之前，细菌包含的噬菌粒可以编码抗体与衣壳蛋白的融合蛋白，同时含有氨苄青霉素抗性。加入辅助噬菌体之后，不仅提供组装完整噬菌体所需的其他蛋白质，同时加入了卡那霉素抗性。

(7) 将 96 孔微量培养板于 4℃，900 *g* 离心 20 min。

(8) 轻轻弃去上清，切勿交叉污染。

(9) 每孔加 150 μl 2× TY (含终浓度为 100 μg/ml 氨苄青霉素和 25 μg/ml 卡那霉素)，轻柔重悬沉淀。

(10) 置湿盒中，30℃孵育振荡过夜 [见注意事项 (11)]。

(11) 将 96 孔微量培养板于 4℃，900 *g* 离心 30 min，把含噬菌体的上清转移到新的 96 孔微量培养板，4℃保存，以备供 ELISA 筛选之用 [见注意事项 (12)]。

3.2.2 ELISA 筛选

(1) 将角质形成细胞用角质形成细胞培养液重悬，按 5000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔组织培养板，孵育过夜。

(2) 同时加入 50 μl 角质形成细胞培养液和 50 μl 50 mmol/L $NaHCO_3$ (pH 9.6)

到组织培养板的其他培养孔，4℃孵育过夜。

（3）移去步骤（1）和步骤（2）的培养液。

（4）每孔加满4% MPBS（通常需300～330 μl），室温孵育2 h。

（5）弃上清，每孔加50 μl 4% MPBS，再加入上一个流程（3.2.1获得单克隆噬菌体）步骤（11）中保存的含有单克隆噬菌体抗体的上清50 μl［见注意事项（13）］，振荡孵育1 h。

（6）弃上清，用PBS洗板6次［见注意事项（14）］。

（7）加入100 μl用2% MPBS作1∶5000稀释的HRP标记抗M13抗体，孵育1 h。

（8）弃上清，洗板6次［同步骤（6）］。

（9）加入100 μl OPD溶液（取4片OPD溶于12 ml双蒸水，再加入5 μl 35% H_2O_2，其H_2O_2终浓度为0.0015%）显色。

（10）待总体背景色开始显现，每孔加入50 μl 1 mol/L H_2SO_4终止反应。

（11）以655 nm为背景参考波长，读取490 nm处的吸光度值。

（12）分析ELISA结果，选择信号高于总体背景，且仅在接种角质形成细胞的检测中为阳性的克隆，行进一步鉴定。在一轮筛选后，阳性克隆通常占所筛选抗体的10%～40%;但是实际上其中能识别角质形成细胞特定抗原的仅有1%～10%，其余的阳性克隆可能结合的是塑料、脱脂奶粉蛋白和培养基成分。

3.2.3 阳性克隆的再筛选

（1）按3.2.1中所述步骤，从第一块主培养板［3.2.1的步骤（4）］中挑取阳性克隆，加入新的主培养板。

（2）重复3.2.1至3.2.2的操作步骤，筛选阳性克隆。

（3）对真阳性克隆进行更详尽的分析。

3.3 抗体多样性分析

因为同一株抗体在筛选时可能从所用的抗体库中被多次筛到，因而需要对阳性抗体的多样性进行分析，减少后续鉴定的工作量。应采用两种不同的方法进行分析鉴别，选择何种方法取决于抗体库的类型。单一骨架抗体库的多样性，如Tomlinson I、J及ETH2抗体库，需要测序分析；而半合成抗体库，如Griffin-1抗体库，可以通过限制性内切核酸酶指纹图谱分析。

3.3.1 指纹图谱

（1）用引物Rev和M13back，以及*Taq* DNA聚合酶做PCR。

（2）纯化PCR产物，如用PCR纯化试剂盒（Qiagen）。

（3）用*Bst*NI配制好限制性消化体系。

（4）60℃酶切2 h，2%琼脂糖电泳分析酶切产物。尽管指纹图谱类似的克隆可能有不同的序列，但根据电泳片段的类型仍可以大致判断所得抗体的多样性。

3.3.2 测序及数据库搜索

（1）用纯化的噬菌粒（如小量质粒提取试剂盒）或纯化的PCR产物测序（如Qia-

gen DNA 纯化试剂盒），测序引物可用 Rev 和 M13back。对噬菌粒的纯化而言，培养液需要添加葡萄糖和抗生素以阻止对大肠杆菌有毒性的融合蛋白表达。

（2）在 V-base DNA 绘图样本数据库中，将从 Griffin-1 抗体库得来的回收序列与表达的人抗体序列进行比对［见注意事项（16）］，了解可变区基因（V 基因）的家族信息。

（3）根据 Kabat 等[8]列出的模型进行序列分析，以获得回收抗体重轻链的互补决定区（高可变区）的序列信息。

3.4 噬菌体展示抗体的进一步分析和应用

噬菌体展示抗体和传统的单克隆抗体一样可以用于多种下游研究的分析，如蛋白质印迹、间接免疫荧光分析和免疫沉淀。在应用分离抗体做这些实验之前，通常需要将抗体表达为可溶性蛋白而非噬菌体展示的方式，因为有些实验中发现，与可溶性蛋白相比，噬菌体展示抗体产生的信噪比还弱。表达可溶性噬菌体展示抗体的方法有很多，最近发表的 FuncFAb 系统有不少优势。这个系统将融合蛋白表达在丝状噬菌体蛋白 III[9] 的 N 端区，融合蛋白可用 C 端的 His-6 标签纯化，同时可用 c-myc 标签进行免疫测定。

3.4.1 将抗体基因片段亚克隆到 FuncFAb 系统

（1）纯化噬菌粒，如用 Qiagen 的基本实验方案，在培养液中加入 1%葡萄糖以抑制抗体融合蛋白的表达。

（2）选择适当的限制性内切核酸酶进行消化，如 FuncFAb 系统的载体 pKBJ3 可用 *Nco*I 和 *Not*I 酶切。纯化好的噬菌粒也可用相应的限制性内切核酸酶酶切。

（3）纯化载体和抗体基因片段，抗体基因片段长度约为 750 bp。

（4）将抗体基因片段连接到凝胶纯化的载体中，连接好后电转化进入细菌表达株，如 TG-1。

3.4.2 利用 FuncFAb 系统表达和鉴定抗体

（1）选取含亚克隆抗体基因 pKBJ3 的单个菌落，接种到 2× TY 培养基（含 100 μg/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖），37℃振荡孵育过夜。

（2）取 10 ml 过夜培养物，接种到 1 L 2× TY 培养基中（含 100 μg/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖），37℃振荡孵育 4 h。

（3）加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（isoproylthiogalactoside，IPTG）终浓度为 1 mmol/L，室温振荡过夜，以诱导抗体表达。

（4）8000 *g* 离心 10 min，沉淀细菌，弃上清，用 30 ml PBS 重悬沉淀物。

（5）用超声破碎器或弗氏细胞破碎器裂解菌体。

（6）25 000 *g* 离心 30 min，使悬液澄清。

（7）将上清加入 Ni-NTA 珠，按 Qiagen 公司的操作手册纯化抗体。

（8）用 ELISA 分析纯化抗体的活性（参见流程 3.2.2），做如下调整：①用 1 μg 和 5 μg 纯化抗体作为一抗；②用鼠源抗 myc 标签抗体 9E10 检测 FuncFAb 系统表达的已纯化抗体；③用 HRP 标记的抗小鼠抗体作为三抗。

(9) 每次孵育的间隔期间，用 PBS 洗板 6 次，再按 3.2.2 的步骤显色。

3.4.3 用可溶性抗体或噬菌体展示抗体做蛋白质印迹

(1) 按 Laemmi 报道的方法[10]用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离细胞提取物。如果要保留蛋白质的一些结构基序，样本不必在上样缓冲液中煮沸，只需在 37℃ 孵育 30 min。

(2) 按 Sambrook 等方法[11]将蛋白质转至 PVDF 膜（Millipore）。①转膜前，将膜浸没在 96%乙醇中活化 30～45 s；②转膜后，将膜浸没在 96%乙醇中灭活 30～45 s［见注意事项（17）］。

(3) 用含 10%甘油的 10% MPBS 浸泡膜，孵育过夜。

(4) 做蛋白质印迹，按 ELISA 检测所述的方法，如检测噬菌体展示抗体，则用 HRP 标记的抗 M13 抗体；如是可溶性抗体，则用 9E10（鼠源抗 myc 标签抗体）和 HRP 标记的抗小鼠抗体。为减少背景，孵育间隔期间漂洗 6 次，每次 5 min。

(5) 用化学发光法显像。

(6) 将观察到的印迹条带类型与已知的二维电泳数据库进行比较，分析同源抗原蛋白的同一性。现有不同细胞类型表达的蛋白质组的多种数据库，如 http://proteomics.cancer.dk。

3.4.4 间接免疫荧光

(1) 采用生物素化的方法［Amersham Pharmacia；见注意事项（18）］将纯化抗体生物素化。

(2) 将角质形成细胞接种于 8 孔载玻片，置于细胞培养箱中过夜培养。

(3) 用含 1%甲醛和 0.1%Tween-20 的 PBS，固定和透化细胞 5 min。

(4) 用 PBS 洗 3 次。

(5) 用 2% MPBS 室温孵育 2 h，封阻玻璃表面的残留结合位点。

(6) 用 PBS 短暂漂洗。

(7) 与用 2% MPBS 稀释成不同浓度的生物素化抗体［取自步骤（1）］室温孵育 1 h。

(8) 用含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤 4 次，再用 PBS 洗涤 4 次。

(9) 与溶于 2%MPBS 的异硫氰酸荧光素标记的亲和素（Extravidin™），室温孵育 30 min。

(10) 用含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤 4 次，再用 PBS 洗涤 4 次。

(11) 封片后用荧光显微镜观察。

3.4.5 同源抗原同一性的免疫沉淀及鉴定

(1) 将纯化抗体生物素化。

(2) 制备细胞提取物：接种 10^6 个角质形成细胞于直径 13.5 cm 的组织培养皿，孵育过夜，培养基中添加 1∶1000 稀释的［^{35}S］-Redivue 细胞标记混合物。

(3) 与含有去垢剂［如含 1～5 mmol/L TritonX-100，见注意事项（19）］和蛋白酶抑制剂（如 100 μmol/L PMSF）的 PBS，冰浴 1 h。

(4) 用细胞刮刮取塑料表面的剩余细胞。

(5) 冰浴 1 h。

(6) 采用台式离心机的最大速度，4℃离心 15 min，沉降不能用洗涤剂提取的物质，可让混悬液澄清。

(7) 取澄清的细胞提取物，加入生物素化抗体，4℃反复颠倒孵育 1 h。

(8) 加入链亲和素包被的磁珠（DynaTM，Norway），孵育 15 min。

(9) 用磁力架分离磁珠。

(10) 用含抽提去垢剂的 PBS 洗 4 次，用 PBS 洗 3 次。

(11) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析样品。

(12) 干胶并利用之，如可用磷光图像分析仪显影沉淀蛋白。

(13) 在初步鉴定提取物的阳性条带后，其余沉淀蛋白的鉴定可以在更大规模上重复进行。

(14) 用考马斯亮蓝染色或银染观察沉淀蛋白，切取沉淀条带，胶内消化该蛋白质，用质谱分析多肽片段，以及结合多肽数据库搜索鉴定蛋白质同一性[3]。

4 注意事项

(1) http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/winterhp.php? menu=1808 链接剑桥 MRC 主页的噬菌体展示区域，从此处可以订购噬菌体展示抗体库。

(2) http://www.hgmp.mrc.ac.uk/geneservice/reagents/products/descriptions/scFv_tomlinsonIJ.shtml 链接 Tomlinson 噬菌体展示抗体库的信息。

(3) http://www.pharma.ethz.ch/bmm/protocols/ eth.html 链接 ETH2 噬菌体展示抗体库的信息。

(4) a. 因为噬菌体污染可以累积在玻璃器皿和移液管上，因此在运用丝状噬菌体工作时，最好使用一次性塑料制品和移液管。

b. 如果用纯化后的单一抗原作为筛选的靶标，可以将其包被于免疫实验用试管（immunotube)(Nunc，Roskilde，Denmark）或者通过标签进行固定。然后用噬菌体展示库与固定后的靶标共同孵育。

(5) 以往噬菌体展示抗体库的筛选过程中，回收了大组分的非特异性噬菌体颗粒，因而存在信噪比过低的问题。引入蛋白酶敏感的辅助噬菌体 KM13 克服了这个难题。KM13 含有的外壳蛋白 III 是负责感染大肠杆菌的外壳蛋白的遗传工程化形式。该蛋白质在感染大肠杆菌的功能域和将外壳蛋白锚固在噬菌体颗粒的功能域之间加入了一个蛋白酶敏感的连接子。胰蛋白酶消化作用不仅切断了抗体与外壳蛋白 III 之间的连接，而且也切除了辅助噬菌体编码的外壳蛋白 III 的两个负责感染的功能域[6]。因此，胰蛋白酶消化后的噬菌体不携带外壳蛋白 III 的融合蛋白，失去感染能力而不能生存。然而，同时包含辅助噬菌体编码蛋白和融合外壳蛋白的噬菌体在胰蛋白酶洗脱后仍具有感染能力。只有加入辅助噬菌体才能重新获得感染能力。这样，可明显增强信噪比，从而提高仅需一轮筛选的回收效率[3]。

(6) 系列稀释的目的主要有两点。

a. 能够检测回收噬菌体颗粒的数量。

b. 便于在后续筛选工作中选取单个菌落，以防在第一个稀释度中有过多的菌落融合在一起。

(7) 用噬菌体展示抗体作为一抗，在 ELISA 结果中容易出现波动，特别是用 96 孔培养板孵育感染大肠杆菌的噬菌体，因此需要再做一次筛选。

(8) 要仔细防止不同培养孔之间的交叉污染。可以用石蜡封口膜覆盖在微量培养板表面加以避免。

(9) 微量培养板接种器（replicator）Boekel Scientific 有售。

(10) 菌液 OD_{600} 接近 0.5 时，浓度约为 5×10^8 个细菌/ml。

(11) 要在过夜培养中获得最高数量的噬菌体颗粒，噬菌体展示抗体的收集至少需要 16 h 的培养。

(12) 含噬菌体抗体库的上清在 4℃保存不要超过 2 天，最好用新鲜的上清液进行筛选。

(13) 切记每孔都必须用新的吸头，以防交叉污染。50 μl 的上清大约含有 5×10^{10} 个噬菌体。

(14) 如果没有 ELISA 洗板机，可以用一个盒子装满 PBS，将微量培养板浸入其中，随后在水槽中翻转微量培养板，弃去缓冲液。

(15) 显色出现的速度不会完全一致。

(16) 可在剑桥 MRC 的主页 http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT.php?menu=901 上就抗体的 V-base 进行比对。

(17) 浸入乙醇可以提高用噬菌体展示抗体检测抗原时的信噪比。

(18) 生物素化可以有效地提高抗体用于染色和沉淀时的灵敏度。

(19) 任何已知的单一去垢剂都不能提取全部膜蛋白，所以最好在初始提取时同时使用多种去垢剂，可以评价何者有助于提取到特定的抗原，如用 ELISA 进行评判，而且该去垢剂还有助于保护抗体和抗原间的相互作用。

致 谢：本文特别感谢丹麦国家科学研究委员会、丹麦技术研究委员会、丹麦分子老年病学中心、Carlsberg 基金会、Novo Nordic 基金会及 Nemod Immunoterapie AG 公司的资助。我们还特别感谢 Brian F. C. Clark 教授的鼓励与支持。

(顾长国 译　李　磊 校)

参考文献

[1] Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., and Hoogenboom, H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 433—455.

[2] Kristensen, P., Ravn, P., Jensen, K.B., and Jensen, K.H. (2000) Applying phage display technology in aging research. *Biogerontology* **1**, 67—78.

[3] Jensen, K.B., Jensen, O.N., Ravn, P., Clark, B.F.C., and Kristensen, P. (2003) Identification of keratinocyte specific markers using phage display and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 61—69.

[4] de Wildt, R.M., Mundy, C.R., Gorick, B.D., and Tomlinson, I.M. (2000) Antibody arrays for high-

throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat. Biotechnol.* **18**, 989—994.

[5] Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P., and Neri, D. (1998) Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J. Biol. Chem.* **273**, 21 769—21 776.

[6] Kristensen, P. and Winter, G. (1998) Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold. Des.* **3**, 321—328.

[7] Norsgaard, H., Glenting, M., Kristensen, P., Clark, B. F. C., and Rattan, S. I. S. (1994) Ageing, differentiation and apoptosis in human epidermal keratinocytes in culture. *Gerontol. Geriatr. Suppl. Arch.* **4**, 185—196.

[8] Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. (eds.) (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Health Services, NIH, Washington DC.

[9] Jensen, K. B., Larsen, M., Pedersen, J. S., Christensen, P. A., Alvarez-Vallina, L., Goletz, S., et al. (2002) Functional improvement of antibody fragments using a novel phage coat protein III fusion system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 566—573.

[10] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680—685.

[11] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Miniatis, T. (eds.) (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

第36章　发育过程中组织特异性DNA甲基化模式的分析

Jun Ohgane，NaKa Hattori，Kunio Shiota

摘　要：我们希望能够建立比常规形态学和细胞类型特异性标记分析更精确的细胞鉴定方法。DNA甲基化是哺乳动物细胞分化和发育的一种关键表观遗传学机制，它与基因活化和基因沉默有关。最近研究表明各种类型细胞存在独特的DNA甲基化模式。DNA甲基化模式也是某一类型细胞储存一系列遗传基因信息的一种机制。本章将讲述通过DNA甲基化模式分析鉴别细胞或组织的方法。

关键词：DNA甲基化；CpG岛；细胞类型特异性甲基化模式；表观遗传学

1　导言

人们一直采用形态学特征和分子标记物来区分细胞。但是，在临床诊治方面，这些传统方法为细胞生成所提供的信息少于新的体外技术，包括干细胞培养及细胞核移植等。而且，经过移植产生的细胞往往不能显示出所需的功能，或者是无法控制生成细胞的生长。因此，我们希望能够建立一种比常规和传统的方法更为准确的细胞鉴定方法。

包括人类在内，哺乳动物的细胞在发育过程中，一旦发生分化就会继承与亲代细胞相同的特征。这些细胞特征将伴随个体生命终身保持。同一个体不同类型细胞都有一套基本相同的基因组信息，但是某一类型细胞所表达出的一套基因不同于其他类型细胞所表达的一套基因。我们发现由于基因组DNA甲基化模式与包括基因沉默的基因活性有关[6]，因此不同的细胞类型有着独特的基因组DNA甲基化模式[1~5]。细胞类型特异性的DNA甲基化模式被认为是承担不同类型细胞储存所遗传的一系列基因信息的一种机制。

本章介绍以下几种分析DNA甲基化状态的方法来鉴别细胞或组织：①DNA甲基化敏感性Southern印迹法；②DNA甲基化敏感性聚合酶链反应（PCR）；③应用限制性指标标记基因组扫描（restriction landmark genomic scanning，RLGS）[7,8]进行全基因组DNA甲基化分析。RLGS是Hayashizaki等[7]最先发展起来的，同时出版了一本有关问题解析和例证的详细操作手册[9]。我们依照这本手册并加以适当修改来阐述RLGS的实验操作过程。

2　材料

2.1　仪器设备

（1）透析管（Sanko Jun-yaku，Tokyo，Japan，molecular cut off 14，000，100 ft；

cat. no. UC27-32-100)：将透析管剪成约 15 cm 的长度，在 2%碳酸氢钠溶液中煮沸或高压灭菌两次，并用灭菌蒸馏水冲洗，再浸泡于蒸馏水中高压灭菌（在使用之前于 4℃可保存数月)。

(2) Scotch 3M 胶带（483 Labo-sealing tape，25.4 mm×32.9 m；cat. no. JT-1400-0802-3)。

(3) 用于 RLGS 第一相电泳的聚四氟乙烯树脂（teflon）管（2.4 mm inner diameter，3.0 mm outer diameter，Sanplatec Corp.，Osaka，Japan；cat. no. 5265E)。

(4) 用于 RLGS 凝胶内消化的聚四氟乙烯树脂管（3.0 mm inner diameter，3.7 mm outer diameter，Sanplatec Corp.，Osaka，Japan；cat. no. 5267E)。

(5) 下列所列 RLGS 电泳组件为日本东京 Bio Craft 公司的产品（电话+81-3-3964-6561，传真+81-3-3964-6443)：第一相电泳设备；第一相电泳用玻璃管（顶部狭窄成斜形用来固定聚四氟乙烯树脂管)；硅胶管；第二相电泳设备；用于第二相电泳的顶部成斜形的玻璃板；用于第二相电泳凝胶的隔板（1 mm 厚)。

(6) RLGS 第一相电泳的圆盘凝胶架：

a. 将聚四氟乙烯树脂管（2.4 mm 内径）剪切成 70 mm 长，顶端削尖。

b. 从玻璃管的宽端穿入聚四氟乙烯树脂管，用钳子拔出约 1 cm 的距离。

c. 将聚四氟乙烯树脂管顶部截去，在距离玻璃管上端留下约 2 mm 长。

d. 用有凸出边的工具的已加热端加压聚四氟乙烯树脂管的顶部，然后将加热了的聚四氟乙烯树脂管顶部在冷却和水平的表面加压。

e. 距离玻璃管下端留下约 2 cm 处将聚四氟乙烯树脂管底部剪断。

f. 用聚四氟乙烯树脂胶带从底部密封住聚四氟乙烯树脂管和玻璃架之间的空隙。

(7) 电洗脱仪（Electoreluter，Bio Craft，Tokyo，Japan；cat. no. BE-883)。

2.2 从哺乳动物组织和细胞中提纯高分子质量基因组 DNA

(1) 蛋白酶 K（Merck，Darmmstadt，Germany；cat. no. 7 0663-4)，用已灭菌蒸馏水配成 10 mg/ml 浓度，每份分装为 1 ml，−20℃可储藏数月。

(2) RNA 酶（DNase-free；Roche，Basel，Switzerland；cat. no. 1 119 915)。

(3) 裂解缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0；150 mmol/L EDTA；1%SDS。经 pH 试纸检验最终 pH 约为 8.0。

(4) β-巯基乙醇（Nacalai Tesque，Kyoto，Japan；cat. no. 214-17)。

(5) 苯酚：氯仿：异戊醇（PCI）为 50：49：1。在 65℃熔化 500 g 结晶苯酚（Nacalai Tesque，Kyoto，Japan；cat. no. 26728-45)，加入 8-羟基喹啉（Wako Pure Chemicals，Osaka，Japan；cat. no. 085-01212）至终浓度为 0.1%。用 500 ml 的 0.5 mol/L Tris-HCl（pH8.0）对酚溶液进行饱和一次，接着用 500 ml 的 0.1 mol/L Tris-HCl（pH8.0）对酚溶液饱和三次。加入 490 ml 氯仿（Wako Pure Chemicals，Osaka，Japan；cat. no. 085-01212）和 10 ml 异戊醇（Wako Pure Chemicals，Osaka，Japan；cat. no. 038-02606）至饱和苯酚溶液。在避光容器中，4℃可存放 2 个月。

(6) 乙醇（−20℃储存)。

(7) TE：10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0；1 mmol/L EDTA，pH 8.0。

2.3 Southern 印迹法评估基因甲基化状态

(1) 甲基化敏感性限制性内切核酸酶[见注意事项 (1)]。

(2) pBluescript II SK$^-$ (Stratagene, San Diego, CA; cat. no. 212206)。

(3) SeaKem GTG 琼脂糖 (FMC Inc., Philadelphia, PA; cat. no. 50070)。

(4) 1× TAE 缓冲液：40 mmol/L Tris-乙酸盐，1 mmol/L EDTA。

(5) 凝胶上样染液：含 0.25%溴酚蓝 (BPB)、0.25%二甲苯蓝 (XC) 和 30%甘油的水溶液。

(6) 0.25 mol/L HCl。

(7) 变性缓冲液：0.5 mol/L NaOH，1.5 mol/L NaCl。

(8) 中和缓冲液：0.5 mol/L Tris-HCl，pH 7.6，1.5 mol/L NaCl。

(9) 20× 标准枸橼酸盐水 (SSC)：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 枸橼酸钠。

(10) 杂交缓冲液：0.4 mol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7.2；7% SDS，1 mmol/L EDTA，5× Denhalt 溶液。

(11) 50× Denhalt 溶液：含 1% Ficoll、1%聚乙烯比咯酮 (PVP) 和 1%牛血清白蛋白 (BSA) 的水溶液 (−20℃可储存 6 个月)。

(12) 10 mg/ml 鲑精 DNA：于 TE 缓冲液中溶解适量鲑精 DNA，超声处理 DNA 数分钟以减小平均分子质量。用 PCI 提取 DNA，乙醇沉淀。将 DNA 溶于 TE 中，将 TE 浓度调整至 10 mg/ml。

(13) 探针：探针应定位于甲基化敏感性酶识别位点的两侧（探针内不包含该酶切位点)。这就能保证在放射自显影中能检测到一个甲基化带和一个非甲基化带，而且两条带的强度与拷贝数成比例。这样，酶识别位点的甲基化程度就可以通过甲基化条带和非甲基化条带的强弱程度计算出来。

(14) DIG DNA 标记试剂盒 (cat. no. 1 175 033)，抗地高辛配基 (digoxigenin)-AP Fab 片段 (cat. no. 1 093 274) 和 CDP-star (cat. no. 1 685 627; Roche, Basel, Switzer-land)。

(15) 马来酸盐缓冲液：0.1 mol/L 马来酸，0.15 mol/L NaCl (用 NaOH 调整 pH 至 7.5，室温可保存 2 个月)。

(16) 10% 封闭缓冲液：加入 10 g 封闭试剂 (Roche, Basel, Switzerland; cat. no. 1 096 176) 于 100 ml 马来酸盐缓冲液，用高压消毒使之溶解，4℃可储存 2 个月。临用前用马来酸盐缓冲液将 10%封闭缓冲液稀释为 1%的工作溶液。

(17) TBST (Tris 缓冲盐水＋0.1% Tween-20)：用蒸馏水稀释 10× TBS (0.2 mol/L Tris-HCl，pH 7.6；1.4 mol/L NaCl) 和 20% Tween-20，至终浓度为 1× TBS 和 0.1%Tween-20。

(18) 缓冲液 3：0.1 mol/L Tris-HCl，pH 9.5；0.1 mol/L NaCl。

2.4 PCR 评估甲基化状态

引物：设计一对位于甲基化敏感性限制性内切核酸酶位点两侧翼的引物（引物 MS：正向引物和反向引物各 25-mer)[见注意事项 (1)]。为便于内部参照，再设计一

对不包含甲基化敏感性酶作用位点的引物（引物 CNTL），所扩增的长度有别于 MS 引物。两对引物在同一管中进行 PCR 反应。经甲基化敏感性酶消化后，用 MS 引物对进行 PCR 反应，目的基因甲基化或非甲基化的酶切序列将分别被扩增或不扩增。

2.5 RLGS

（1）Klenow 片段（Takara，Kyoto，Japan；cat. no. 2140A）。

（2）测序酶 Ver. 2（USB，Cleveland，OH；cat. no. E70775Y）。

（3）*Not*I、*Pvu*II 和 *Pst*I（Nippongene，Toyama，Japan；cat. no. 310-01454，311-00281 and 318-01771）。

（4）dCTPαS 和 dGTPαS（NEN，Boston，MA；cat. no. NLP-011 and NLP-012）。

（5）ddATP、ddTTP、ddCTP 和 ddGTP（Takara，Kyoto，Japan；cat. no. 4031，4034，4033，4032）。

（6）[α-^{32}P] dCTP（6，000 Ci/mmol）和 [α-^{32}P] dGTP（6000 Ci/mmol；NEN，Boston，MA；cat. no. NEN513Z，NEN514Z）。

（7）*Sca*I（Takara，Kyoto，Japan；cat. no. 1084A）。

（8）pBluescript II SK$^-$（Stratagene，San Diego，CA；cat. no. 212206）。

（9）0.1% BSA 和 0.1% Triton X-100（Takara，Kyoto，Japan）。

（10）10× H 缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；100 mmol/L $MgCl_2$，1 mol/L NaCl；10 mmol/L 二硫苏糖醇，室温可储存数月。

（11）掩蔽缓冲液：4× H 缓冲液，40 mmol/L 二硫苏糖醇，1.6 μmol/L dGTPαS，0.8 μmol/L dCTPαS，1.6 μmol/L ddATP，1.6 μmol/L ddTTP，−20℃可储存 6 个月。

（12）2.5× SHB：375 mmol/L NaCl，0.025% BSA，0.025% Triton X-100，−20℃可储存 1 年。

（13）第二消化缓冲液：132 μmol/L ddGTP，132 μmol/L ddCTP，15.8 mmol/L $MgCl_2$，−20℃可储存 6 个月。

（14）10× 第一相电泳缓冲液：溶解 242 g Tris、109 g 含三分子结晶水的乙酸钠、42 g NaCl、23.4 g EDTA-Na_2 于 1.8 L 蒸馏水，用乙酸调节 pH 至 8.15，加蒸馏水至 2 L，高压灭菌，室温可储存数月。

（15）SeaKem GTG 琼脂糖（FMC Inc.，Philadelphia，PA；cat. no. 50070）。

（16）用于第一相电泳的 6× 染色溶液：0.1% 溴酚蓝（BPB），0.1% 二甲苯蓝（XC），30% 甘油，150 mmol/L EDTA，pH 8.0。

（17）5× TBE：溶解 270 g Tris、138 g 硼酸、23.3 g EDTA-Na_2 于 4 L 蒸馏水，并调节至 5 L。

（18）丙烯酰胺和亚甲基双丙烯酰胺（Wako Pure Chemicals，Osaka，Japan；cat. No. 019-110025 and 130-08172）。

（19）过硫酸铵和 *N'*-四甲基乙烯二胺（TEMED）（Amersham Pharmacia Biotech，Uppsala，Sweden；cat. no. 17-1311-01 and 17-1312-9）。

（20）连接凝胶：0.8% GTG 琼脂糖和 5% 蔗糖溶于 1× TBE 缓冲液中。

（21）第二相电泳用染液：0.25% BPB、0.25% XC 溶于 TE 缓冲液（无甘油）。

（22）T4 DNA 连接酶（Promega，Madison，WI；cat. no. M1801）。

（23）LA-*Taq* DNA 聚合酶，配有富含 GC 缓冲液 II（Takara，Kyoto，Japan；cat. no. RR02BG）。

（24）MicroSpin™ S-400 柱（Amersham Pharmacia Biotech；cat. no. 27-5140-01）。

（25）*Not*I 接头（5′-ACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGC-3′ 和 5′-pGGC-CGC GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGT-3′）：70℃ 在 200 μl TE 中温育两种寡聚物（各 2 nmol）10 min，冷却至室温［见注意事项（2）］。退火 *Not*I 接头产生 5′凸出末端（接头终浓度是 10 pmol/μl）。

（26）*Pst*I 接头（5′-pGTGTACTGCACCAGCAAATCC-3′ 和 5′-GGATTTGCTG-GTGC AGTACACTGCA-3′）：退火反应条件与 *Not*I 接头相同［见 2.5 的（25）］。退火的 *Pst*I 接头产生 3′凸出末端（接头终浓度是 10 pmol/μl）。

（27）引物：Ad-NI（5′-AGGGTTTTCCCAGTCACGACGCGG-3′）和 Ad-PI（5′-TTGC TGGTGCAGTACACTGCAG-3′）。

3 方法

3.1 从哺乳动物组织、培养细胞和精子中提纯高分子质量的基因组 DNA

PCI 抽提前按下列步骤预处理标本。

3.1.1 组织标本

（1）将 2 ml 裂解缓冲液与组织一起冻结，并用锤将其敲碎成小块。

（2）在液氮中预冷研钵、研杵和 50 ml 试管。

（3）在预冷的研钵中将 0.1～0.5 g 组织研成粉末。

（4）转移组织粉末到预冷的 50 ml 试管中，加入 10～25 ml 裂解缓冲液（内含 150 μl 浓度为 10 mg/ml 的蛋白酶 K 溶液）。

（5）用匙板轻轻混匀，置 55℃温育 20 min。

3.1.2 培养细胞

（1）4℃，500 *g* 离心 5 min，收集（1～5）$\times 10^7$ 个细胞，弃上清液。

（2）加入 5 ml 裂解缓冲液（无 SDS），将细胞重悬。

（3）加入 500 μl 10% SDS，至其终浓度为 1%，轻轻上下颠倒充分混匀。

（4）加入 24 μl 10 mg/ml 蛋白酶 K，在管中上下颠倒轻轻混匀，置 55℃温育 20 min。

3.1.3 精子

（1）收集来自附睾尾的精子，置于盛有磷酸盐缓冲盐溶液的培养皿中，并将其移入有磷酸盐缓冲液的 50 ml 管内（收集来自 10～20 只小鼠的精子或 3～5 只大鼠的精子混合在一起，用于 DNA 提取）。

（2）4℃，3000 *g* 离心 10 min，弃上清。

(3) 用吸管加入无 SDS 的 5 ml 裂解缓冲液，重悬精子。

(4) 加 500 μl 10% SDS 和 50 μl 14.4 mol/L β-巯基乙醇，用吸管轻轻吹打混匀（SDS 和 β-巯基乙醇的终浓度分别为 1%和 0.144 mol/L）。

(5) 置 37℃温育 30 min（β-巯基乙醇可减少鱼精蛋白的 S—S 键结合，此步对蛋白酶 K 的完全消化至关重要）。

(6) 加入 200 μl 10 mg/ml 蛋白酶 K，置 55℃温育 30 min。

接下来，加入等体积 PCI，在室温下以 25 r/min 旋转混匀 30 min。在室温下以 3000 *g* 离心 30 min。用宽口的 1000 μl 或 5000 μl 吸头将水相转移到另一新 50 ml 试管。重复 PCI 处理，离心并将水相移入到已用 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 预平衡的透析管中。每 4 只透析管用 1 L 10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），透析三次（2 h、2 h 和过夜）；再将透析液移入到 50 ml 管中，并按 1∶1000 的容积比加入 1 mg/ml 的 RNA 酶 A，置 37℃温育 2 h。然后将标本分装到数只 50 ml 管中（每管标本量少于 10 ml），缓慢加入 40 ml 冰冷的乙醇，小心保持 DNA 溶液与乙醇之间的分界，以 15 r/min 的速度缓慢旋转 30 min，混匀 DNA 溶液和乙醇。用 200 μl 黄吸头吸取 DNA 沉淀转移到 1.5 ml 管，再用 200 μl 黄吸头小心吸尽乙醇，晾干 DNA 沉淀数分钟（不要太干）。最后，在进行 DNA 甲基化分析前，可用 TE 缓冲液溶解，于 4℃保存数天［见注意事项 (3)］。

3.2 甲基化敏感性限制性内切核酸酶的 Southern 印迹

本节以甲基化敏感性的限制性内切核酸酶 *Not*I 为例，阐述了评估基因组 DNA 甲基化状态的 Southern 印迹操作步骤。为简化结果，事先将基因组 DNA 用 *Pst*I 酶切成片段，而在 *Pst*I 酶的识别序列里面不包含可甲基化 CpG。

3.2.1 限制性内切核酸酶的消化和电泳［见注意事项 (4)］

(1) 按下列步骤用 *Pst*I 消化基因组 DNA：20 μg 基因组 DNA、5 μl 10× H 缓冲液和 3 μl *Pst*I（10 U/μl）。加灭菌蒸馏水到总体积 50 μl，充分混匀。

(2) 将 2 μl 混合液转移到 1.5 ml 管内，管中预加入经 *Sca*I 线性化的 pBluescript II SK$^-$ 载体（0.1 μg 溶于 8 μl 的 1× H 缓冲液中），以确保基因组 DNA 被完全消化。

(3) 两管置 37℃温育过夜。

(4) 在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳质粒标本。除了基因组 DNA 的条带之外，完全消化的质粒另有 1.9 kb 和 1.1 kb 的条带。如仍有 3 kb 的未消化质粒带，标本应再进一步用 *Pst*I 消化，直到完全消化为止［见注意事项 (5)］。

(5) 用乙醇沉淀经 *Pst*I 消化的基因组 DNA，将其溶解于 30 μl TE 中。

(6) 从上一步 *Pst*I 消化的基因组 DNA 中取一半依下列步骤进行消化：15 μl *Pst*I 消化的 DNA；3 μl 10× H 缓冲液；3 μl 0.1%BSA；3 μl 0.1% Triton X-100；2 μl *Not*I（10 U/μl）。加灭菌蒸馏水到总体积 30 μl，充分混匀。

(7) 为验证消化效果，将 2 μl 上述混合液转移到 1.5 ml 管内，管中预加入经 *Sca*I 线性化的 pBluescript II SK$^-$ 载体（0.1 μg 溶于 8 μl 的 1× H 缓冲液中）。

(8) 两管置 37℃温育过夜。

(9) 参照步骤(4)的方法确保完全消化。

(10) 用乙醇沉淀经两次消化的DNA，并溶解于16 μl TE中。

(11) 测定DNA浓度，用TE调整至5 μg/15 μl。

(12) 将15 μl DNA (5 μg) 与凝胶上样缓冲液混匀，再用1× TAE缓冲液配制的1.4% GTG琼脂糖凝胶上电泳。

(13) 用0.5 μg/ml溴化乙锭溶液对DNA进行染色。

(14) 在凝胶旁放一透明尺，紫外灯下照相。

3.2.2 毛细管印迹转移DNA到尼龙膜

(1) 在蒸馏水中轻轻摇动凝胶，除去多余的溴化乙锭。

(2) 倾斜盛有凝胶的塑料盘，让凝胶的上1/3浸泡在0.25 mol/L HCl中，轻轻摇动凝胶10 min，以利于部分降解高分子质量的DNA。

(3) 在变性缓冲液中浸泡凝胶，轻轻摇动两次，每次15 min，以变性其中的DNA。

(4) 在中和缓冲液中浸泡凝胶，轻轻摇动两次，每次15 min，以便将其中和。

(5) 当凝胶浸泡在中和缓冲液中时，将尼龙膜(BIODYNE A：PALL，Port Washington，NY)切成与凝胶一样的大小，先后用蒸馏水和20× SSC平衡尼龙膜(平衡前，用铅笔记录日期和标本名等信息，以利于区分印迹膜)。

(6) 以20× SSC将已中和的DNA从凝胶经毛细管印迹转移到膜上(完全去除凝胶和膜之间的气泡)。

(7) 用圆珠笔标记好样本孔的位置，将凝胶撕下。

(8) 风干膜，120 000 μJ的条件下紫外线交联三次(将膜密封在可隔热的塑料袋内，可储存于室温直至使用)。

3.2.3 探针标记

(1) 准备基因组DNA目的区域的DNA片段。

(2) 将已纯化DNA 300 ng煮沸10 min以变性，再置于冰上冷却5 min。

(3) 配制下列各项(DIG DNA标记试剂盒，Roche)：15 μl热变性DNA；2 μl核苷酸六聚体混合物；2 μl dNTP混合物；1 μl Klenow片段，总体积为20 μl。置37℃温育过夜。

(4) 加0.5 mol/L EDTA 1 μl以终止反应，在共沉淀剂参与下用乙醇沉淀标记的DNA。

(5) 将DNA溶解于50 μl TE中。用300 ng模板DNA经过夜反应，即可制成500 ng的标记探针，这种探针的终浓度约为10 ng/μl。

(6) 标记探针在−20℃能储存6个月。

3.2.4 杂交和检测

(1) 将150 μl 10 mg/ml的鲑精DNA煮沸10 min，再放置于冰上3 min。

(2) 将变性鲑精DNA与15 ml杂交缓冲液加入到带有印迹膜的塑料盘中。

(3) 60℃温育预杂交1 h。

(4) 将 160 ng DIG 标记探针在 100 μl TE 中煮沸 10 min，再放置冰上 3 min。

(5) 在有印迹膜的塑料袋内加入变性探针和杂交缓冲液（6 cm×11 cm 的膜用 8 ml），密封前混匀（探针的终浓度是 20 ng/ml）。

(6) 去除气泡，封闭塑料袋。

(7) 在 60℃杂交过夜。

(8) 打开塑料袋，弃去含探针的杂交缓冲液。

(9) 在盛有 2× SSC/0.1% SDS 的塑料盘中，68℃条件下洗膜三次，每次 5 min。

(10) 在 0.1× SSC/0.1% SDS 中 68℃条件下洗膜三次，每次 5 min。

(11) 在 TBST 中轻轻摇动漂洗膜 3 min，以去除 SDS。

(12) 用马来酸盐缓冲液简短漂洗膜，再加入 1%封闭缓冲液封闭，各 1 min。

(13) 把膜放在 15 ml 的 1 %封闭缓冲液中，室温轻摇 1.5 h 以封闭之。

(14) 在浸泡膜的封闭缓冲液中加 1.5 μl 抗地高辛配基-AP Fab 片段，室温轻轻摇动 1 h（抗体稀释比例为 1∶10 000）。

(15) 室温下，在盛有 TBST 的塑料盘中洗膜三次，每次 10 min。

(16) 室温下，在缓冲液 3 中平衡膜 10 min。

(17) 用缓冲液 3 将 4 μl CDP-Star 稀释成 400 μl，分散滴在塑料袋内。

(18) 将膜放在塑料袋内，使 DNA 面紧贴 CDP-Star，排除气泡后封闭塑料袋。

(19) X 射线片上曝光 15 min，冲洗成像。

(20) 根据杂交信号强度再次曝光成像 。

3.3 PCR 评估甲基化状态

本节以 *Not*I 为例阐述一种粗略评估甲基化敏感性限制性内切核酸酶位点的甲基化状态的简单 PCR 方法。

(1) 用相应限制性内切核酸酶消化 5 μg 基因组 DNA，该酶的识别序列中不含 CpG，确保 PCR 扩增的靶序列没有此酶识别位点（此步骤仅为基因组 DNA 的简化操作，不需要将其完全消化）。

(2) 用 PCI 抽提被消化的 DNA，再用乙醇沉淀，溶于 30 μl TE 中。

(3) 用 *Not*I 依下列步骤消化一半的 DNA：15 μl 酶切片段化的基因组 DNA；3 μl 10× H 缓冲液；3 μl 0.1% BSA；3 μl 0.1% Triton X-100 和 2 μl *Not*I（10 U/μl）。加灭菌蒸馏水到总体积 30 μl。

(4) 为确认消化效果，将 2 μl 上述混合液转移到 1.5 ml 管内，管中预加入经 *Sca*I 线性化的 pBluescript II SK$^-$ 载体（0.1 μg 溶于 8 μl 的 1× H 缓冲液中）。

(5) 将两管置 37℃温育过夜。

(6) 通过电泳检查质粒的消化效果，以验证基因组 DNA 被完全消化［见注意事项(5)］。

(7) 乙醇沉淀经 *Not*I 消化的 DNA，并溶解于 16 μl TE 中。

(8) 测定 DNA 浓度，用 TE 调整至 100 ng/μl。

(9) 按以下方法制备 PCR 反应液，轻轻吹吸混匀：3 μl 酶消化 DNA（100 ng/μl）；2 μl 10× PCR 缓冲液；2 μl dNTP 混合物（每种 2 mmol/L ）；0.5 μl 引物 MS-F（10 nmol/

μl)；0.5 μl 引物 MS-R（10 nmol/μl）；0.5 μl 引物 CNTL-F（10 nmol/μl）；0.5 μl 引物 CNTL-R（10 nmol/μl）；1.2 μl $MgCl_2$（25 mmol/L）；0.2 μl *Taq* DNA 聚合酶；9.6 μl 灭菌蒸馏水，总体积 20 μl。

（10）扩增经酶消化的 DNA，其反应条件是 94℃ 1 min，50～65℃（根据引物序列而定）30 s，72℃ 1 min，共 30 个循环。

（11）PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色。

3.4 RLGS 步骤

本节介绍基于基因组 DNA 双相电泳的研究全基因组基因位点（CpG 岛）甲基化状态的 RLGS 实验方法。

3.4.1 电泳前基因组 DNA 的处理

（1）用限制性内切核酸酶消化前按下列步骤掩蔽基因组 DNA 的缺口，以避免非特异标记：7 μl 样本基因组 DNA（0.5～1.0 μg/μl）；2.5 μl 掩蔽缓冲液；0.5 μl Klenow 片段；总体积 10 μl。

（2）轻轻吹吸，充分混匀，置 37℃温育 20 min，然后 65℃温育 30 min，灭活 Klenow 片段。

（3）进行 *Not*I 消化：10 μl 已掩蔽标本；8 μl 2.5× SHB 和 2 μl *Not*I（10U/μl），总体积 20 μl 。

（4）为确认消化效果，将 2 μl 上述混合液转移到 1.5 ml 管内，管中预加入经 *Sca*I 线性化的 pBluescript II SK^- 载体（0.1 μg 溶于 8 μl 的 1× H 缓冲液中）。

（5）把两管置 37℃温育 4 h。

（6）通过电泳以验证基因组 DNA 已完全消化［见注意事项（5）］。

（7）标记：18 μl *Not*I 消化的标本；1 μl [α-^{32}P] dCTP；1 μl [α-^{32}P] dGTP；0.3 μl 1 mol/L DTT；0.3 μl 测序酶 Ver. 2（13 U/μl），总体积为 20.6 μl。

（8）置 37℃温育 1 h。

（9）*Pvu*II 消化：20.6 μl 已标记标本；7.6 μl 第二次消化的缓冲液；2 μl *Pvu*II（10 U/μl），总体积为 30.2 μl。

（10）置 37℃温育过夜（电泳前 *Pvu*II 消化的标本能在 4℃保存数天）。

3.4.2 第一相凝胶电泳和用第三限制性内切核酸酶（*PstI*）进行凝胶内 DNA 的片段化

（1）按下列各项准备第一相电泳的凝胶：10 ml 10× 第一相缓冲液；0.9 g GTG 琼脂糖（终浓度为 0.9%）；5 g 蔗糖（终浓度为 5%），用蒸馏水补足至 90 ml，微波炉中融化琼脂糖。经 0.22 μm 孔径滤纸过滤，用预热的蒸馏水补足至 100 ml，凝胶溶液置 55～60℃水浴箱中保温。

（2）将凝胶模具的顶部与三通阀的底部用 2～3 cm 长的硅胶管连接，并在三通阀顶部连接 5 ml 塑料注射器。

（3）将与注射器连接的凝胶模具安装在台架上。从凝胶模具的底部逐渐吸取第一相电泳凝胶直到凝胶模具顶部 1 cm 处的高度，关闭阀门。

（4）待凝胶凝固后，打开阀门，去除连接三通阀的硅胶管。

（5）放置凝胶模具到第一相电泳槽中，分别加入 350 ml 的 1× 第一相电泳缓冲液到底槽，250 ml 到上槽。

（6）使用带 19 号针头的 5 ml 注射器除去凝胶模具内空气（在加入热标本前检查电流：4 块凝胶 100 V 时的电流通常为 2～3 mA）。

（7）将 12.5 μl 标本与 2.5 μl 6× 染色溶液混匀［见注意事项（6）］。

（8）100 V 电泳 1 h，然后 230 V 电泳过夜，直到溴酚蓝电泳到距离凝胶胶顶 50 mm 处。

（9）用抽吸器从上槽中吸出缓冲液，取出凝胶模具（小心电泳后的缓冲液已被^{32}P污染）。

（10）用截断的 200 μl 吸头套在 1 ml 注射器上，吸取凝胶内消化缓冲液（1× H 缓冲液），并慢慢将凝胶细条推出。

（11）在离溴酚蓝（约 500 bp）大约 5 cm 的低分子质量处切除凝胶细条，弃去小于 500 bp 位置的凝胶。

（12）将凝胶条放入已盛 40 ml 1× H 缓冲液的 50 ml 管中，轻轻振摇管子 10 min，以平衡凝胶。

（13）更换缓冲液，再次振摇管子 10 min。

（14）将已平衡过的凝胶条放入白色的塑料盘中，盘下放有黑色的赛璐珞片（大约塑料盘的一半大小）（白色有助于区别分辨 BPB 和 XC 染料的颜色，而黑色有助于显示凝胶的形状）。

（15）将 1× H 缓冲液倒入塑料盘。

（16）从 BPB 一侧轻轻吸取凝胶条，放入聚四氟乙烯树脂管（内径 3.0 mm，长 42 cm），此管用 1.5 cm 硅胶管与 5 ml 注射器相连。

（17）慢慢地拉注射器芯，吸去聚四氟乙烯树脂管内缓冲液。

（18）缓慢地吸取 1200 μl 1× H 缓冲液（含 1200U *Pst*I 和 0.01% BSA），加入聚四氟乙烯树脂管［见注意事项（7）］。

（19）移去注射器，用 1.5 cm 的硅胶管将聚四氟乙烯树脂管的一端与另一端连接成环状。

（20）置 37℃温育 2 h。

3.4.3 第二相电泳

（1）用 70%乙醇擦洗第二相电泳装置的玻璃平板表面，并将玻璃平板的其中一面硅化（这面不倾斜）。

（2）组装好第二相电泳装置，以 Scotch 3M 胶带封闭靠近仪器底部的侧孔。

（3）在 1× TBE 中制备 2.5 L 5%丙烯酰胺（丙烯酰胺 120.8 g 和亚甲基双丙烯酰胺 4.2 g，丙烯酰胺：双丙烯酰胺=29：1）凝胶溶液，加入 1.7 g 过硫酸铵。

（4）添加 677 μl TEMED，将丙烯酰胺凝胶溶液倒入第二相电泳模具。

（5）用水饱和的 2-丁醇覆盖凝胶表面，放置约 2 h，直到凝胶固化。

（6）除去仪器底部密封侧孔的 Scotch 3M 胶带。

（7）洗掉 2-丁醇，将 1× TBE 缓冲液装到凝胶顶部（检查缓冲液不漏），一直保留

到电泳前。第（1）～（7）步必须在凝胶内消化结束前完成。

（8）用 1× TBE 冲洗第二相丙烯酰胺凝胶的顶部，再用 Whatman 3MM 滤纸轻擦凝胶表面。

（9）将经 *Pst*I 处理过的凝胶条从聚四氟乙烯树脂管挤入含 40 ml 1× TBE 的 50 ml 管中。

（10）轻摇 10 min，以平衡凝胶。

（11）弃去缓冲液，将已平衡过的凝胶放在黑色的赛璐珞片上。

（12）用 Kim wipe 牌纸巾轻擦凝胶表面。

（13）转移凝胶条到第二相丙烯酰胺凝胶的顶部。

（14）使用带 19 号针头的 5 ml 注射器吸约 2 ml 琼脂糖凝胶，将凝胶条和第二相丙烯酰胺凝胶连接起来。

（15）以无甘油的 6× 染色溶液覆盖已连接的凝胶表面。

（16）先 100 V 电泳 1 h，再 150 V 电泳 20 h ，直到溴酚蓝移动到电泳仪底部的侧孔处。

3.4.4 放射自显影

（1）小心地除去覆盖在凝胶上的玻璃平板。

（2）在丙烯酰胺凝胶的中央放置一张 Whatman 3MM 滤纸（34.5 cm×42.5 cm，每张比 35 cm×43 cm 的暗盒小 5 mm)，用保险刀片沿着滤纸将凝胶切下。

（3）拾取带滤纸的已切凝胶，在凝胶表面覆盖热敏塑料制成的 Saran 包装膜。

（4）80℃约 20 min，烘干凝胶。

（5）用检测仪检查凝胶中心的放射性和第二相丙烯酰胺凝胶顶部的最强放射性的点。

（6）根据放射强度在－80℃自显影 2～4 周［见注意事项（8)]。

3.4.5 斑点 DNA 的克隆

3.4.5.1 用于克隆的双相电泳

（1）用 RLGS 部分 3.4.1 中所述的相同方法标记基因组 DNA，可观察到目的序列的斑点。

（2）用 *Not*I 和 *Pvu*II 消化同一基因组 DNA（未标记)。

（3）按下列顺序混匀标记和未标记的 DNA 标本［见注意事项（9)]：30.2 μl 已标记 DNA 标本，25 μl 用于第一相电泳的 6× 染色溶液（含 150 mmol/L EDTA)；39.6 μl TE；30.2 μl 未标记 DNA 标本，总体积为 125 μl。

（4）每孔加入 12.5 μl 混合标本（共 10 孔凝胶)，运行 RLGS 。

（5）65℃烤干第二相电泳凝胶，在多处（每块凝胶至少 10 个位置）将已烘干的凝胶与 X 射线片用订书钉订在一起，以便辨认凝胶和 X 射线片的位置。

（6）放射自显影曝光 1 个月，显像，再装订凝胶和自显影照片。

3.4.5.2 接头连接及 PCR 扩增

（1）打孔器取出感兴趣的斑点，从烤干的点状凝胶上剥去热敏塑料制成的 Saran 包装膜。

（2）在 1× TBE 缓冲液中 200 V 电洗脱 DNA 20 min。

（3）用等体积 PCI 提取 DNA，15 000 *g* 离心 1 min。

（4）在共沉淀剂存在下用乙醇沉淀 DNA，并溶于 3 μl TE 中。

（5）配制下列反应液并吹吸混匀：3 μl 斑点 DNA 洗脱液；0.5 μl *Not*I 接头（10 pmol/μl）；0.5 μl *Pst*I 接头（10 pmol/μl）；5 μl 2× 连接缓冲液；1 μl T4 DNA 连接酶，总体积为 10 μl。

（6）4℃温育过夜。

（7）加入 30 μl TE 在 MicroSpin S-400 柱内，700 *g* 离心 1 min 过柱，除去过多接头。

（8）混合下列的试剂进行 PCR：14.5 μl 已接头连接的斑点 DNA；25 μl 2× 富 GC 缓冲液 II；8 μl dNTP（各 3.2 mmol/L）；1 μl Ad-NI 引物（10 pmol/μl）；1 μl Ad-PI 引物（10 pmol/μl）；0.5 μl LA-Taq 酶（Takara 公司），总体积为 50 μl 。

（9）扩增已接头连接的 DNA：94℃ 1 min，65℃ 30 s，72℃ 1 min，30 个循环。

（10）取 5 μl PCR 产物在琼脂糖凝胶中电泳。如果电泳条带太弱或看不见，以第一次 PCR 产物溶液 1 μl 为模板，进行第二次扩增。

（11）用 *Not*I 和 *Pst*I 双重消化 PCR 产物。

（12）连接至经 *Not*I 和 *Pst*I 16℃ 2 h 消化的 pBluescript II SK^- 质粒。

（13）转化质粒到感受态大肠杆菌（XL-1Blue MRF′），选择含有 *Not*I 酶切位点质粒的阳性菌落。

3.4.6 进一步的分析

据报道，大约 90% 的 *Not*I 酶切位点存在于 CpG 岛内，这是密集的 CpG 区域。包含 *Not*I 酶切位点的基因组区域作为限制性标志，能显示不同细胞类型之间的甲基化差异。采用其他方法，包括 DNA 甲基敏感性限制性酶切 Southern 印迹、PCR（本章所述）和重亚硫酸钠测序法[10]（本章未述），可以更深入分析这些区域。

4 注意事项

（1）在 REBASE 的首页（http://base.neb.com/base/base.html）有一详细目录，列举了数以百计的甲基敏感性限制性内切核酸酶和甲基化酶，也包括了酶供应商和甲基化碱基影响消化能力的详细位置效应的信息。因此，参考这些信息，就能决定哪一个酶适合来评价目的基因的甲基化状态。

（2）将 1.5 ml 退火反应管漂浮在盛有 70℃ 500 ml 水的烧杯中，直到温水变凉至室温。

（3）组织标本的 DNA 沉淀溶解于 100～300 μl TE 缓冲液中，精子和培养细胞的 DNA 沉淀溶解于 50～100 μl TE 缓冲液中。要获得 RLGS 的精细结果，高质量基因组 DNA 的纯化非常重要。因此，必须避免内源性 DNA 酶对 DNA 的降解和机械切应力对 DNA 的损伤。

（4）在哺乳动物的基因组中，甲基敏感性限制性内切核酸酶的识别部位包括可甲基化的 CpG 二核苷酸，常比想象的要少 1/4～1/5。因此，要在普通琼脂糖凝胶上清楚地分开甲基化和未甲基化的条带，必须首先用一种或两种酶切位点不含可甲基化 CpG 的

限制性内切核酸酶来将基因组 DNA 片段化。

(5) 只要酶的总体积不超过反应液的 10%，限制性内切核酸酶就能直接加入到反应体系中。通过 PCI 抽提和乙醇沉淀获得的纯化基因组 DNA，有助于 DNA 的消化，防止某些污染物抑制酶切反应。

(6) 第一相电泳的标记基因组 DNA 的加入量必须少于 1 μg。上样过多会导致在高分子质量区出现模糊条带和高背景。通常标记的 DNA 用 TE 按 1∶1～1∶5 稀释，可提供适合第一相电泳的 DNA 浓度。

(7) 凝胶内消化时高甘油残留物可引起放射自显影照片的高背景。因此，应购买高浓度的 *Pst*I 酶用于凝胶内消化，可以将甘油浓度降至最低。

(8) 应用图像分析器检查 RLGS 斑点模式既简单又快捷。然而，要获得精细的斑点图和比较斑点模式，最好使用 X 射线片照相。

(9) 已标记的 DNA 在放射自显影照片中显示出斑点，可以在这些斑点的同一位置克隆未标记的 DNA。因为在 6× 染色溶液中添加 150 mmol/L EDTA 可以保证测序酶的完全灭活，因此，在已标记的 DNA 添加 6× 染色溶液以前，千万不要加入未标记的 DNA。

（王　刚 译　刘泽军 校）

参考文献

[1] Shiota, K., Kogo, K., Ohgane, J., Imamura, T., Urano, A., Nishino, K., et al. (2002) Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* **7**, 961—969.

[2] Ohgane, J., Wakayama, T., Kogo, Y., Senda, S., Hattori, N., Tanaka, S., et al. (2001) DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* **30**, 45—50.

[3] Imamura, T., Ohgane, J., Ito, S., Ogawa, T., Hattori, N., Tanaka, S., et al. (2001) CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene: tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons. *Genomics* **76**, 117—125.

[4] Cho, J.-H., Kimura, H., Minami, T., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S., et al. (2001) DNA methylation regulates placental lactogen-I gene expression. *Endocrinology* **142**, 3389—3396.

[5] Shiota, K. and Yanagimachi, R. (2002) Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. *Differentiation* **69**, 162—166.

[6] Bird, A. P. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6—21.

[7] Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Okazaki, Y., Hatada, I., Shibata, H., Kawai, J., et al. (1993) Restriction landmark genomic scanning method and its various applications. *Electrophoresis* **14**, 251—258.

[8] Ohgane, J., Aikawa, J., Ogura, A., Hattori, N., Ogawa, T., and Shiota, K. (1998) Analysis of CpG islands of trophoblast giant cells by restriction landmark genomic scanning. *Dev. Genet.* **22**, 132—140.

[9] Hayashizaki, Y. and Watanabe, S. (eds.) (1997) *Restriction Landmark Genomic Scanning* (RLGS). Springer-Verlag, Tokyo.

[10] Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., et al. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1827—1831.

第37章　人角质形成细胞和表皮的基因表达系列分析

Bastiaan J. H. Jansen，Gys de Jongh，Joost Schalkwijk，Fred van Ruissen

摘　要：由于多个基因组测序工作的完成，对大规模基因表达分析工具的需求日益增加。其中之一，如基因表达的系列分析（SAGE）是一种既能定性又能定量分析特定组织或培养模型中大量基因的技术。SAGE已经成功地应用于鉴别正常生理过程和病理情况下基因的差异性表达。本章主要介绍SAGE的基本流程及其在培养的人角质形成细胞中的应用；以及微量SAGE，它是一种改进的SAGE技术，可以对取自已分离表皮或皮肤活检标本的很少量mRNA进行分析。

关键词：基因表达系列分析；微量基因表达系列分析；角质形成细胞；表皮；皮肤；基因表达

1　导言

人类基因组测序完成后，人们对可以大规模分析基因表达的方法越来越感兴趣。现在有许多方法，如cDNA微阵列分析和基因表达系列分析（serial analysis of gene expression，SAGE）[1]［见注意事项（1）］。SAGE对特定细胞类型或组织中基因表达的大规模分析既能定量也可定性，可应用于许多疾病或细胞培养条件下差异表达基因的鉴定[2~7]。SAGE在方法学上的三个原则包括：①如果这个标签是从每一cDNA内对应的特定转录物的一个独特位置（一种限制性内切核酸酶最远端酶切位点的3′端）获取的，那么这个短的10～14bp的序列或标签包含了可以独特地鉴别一个转录物的足够信息；②序列标签能够连接起来形成可以被克隆和测序的一个个长的序列；③特定标签的倍数定量分析反映了相应转录物的表达水平。SAGE技术的简略示意图见图37.1。本章主要关注SAGE在培养人角质形成细胞中的应用，以及改进后的微量SAGE，该技术所需初始mRNA模板量很少，通常取材于少量样本，如从皮肤活检标本分离出的表皮[8~11]。

2　材料

2.1　溶液

（1）2×B＋W缓冲液：10 mmol/L Tris-盐酸，pH 7.5；1 mmol/L EDTA，pH 8.0；2 mol/L氯化钠；室温保存。

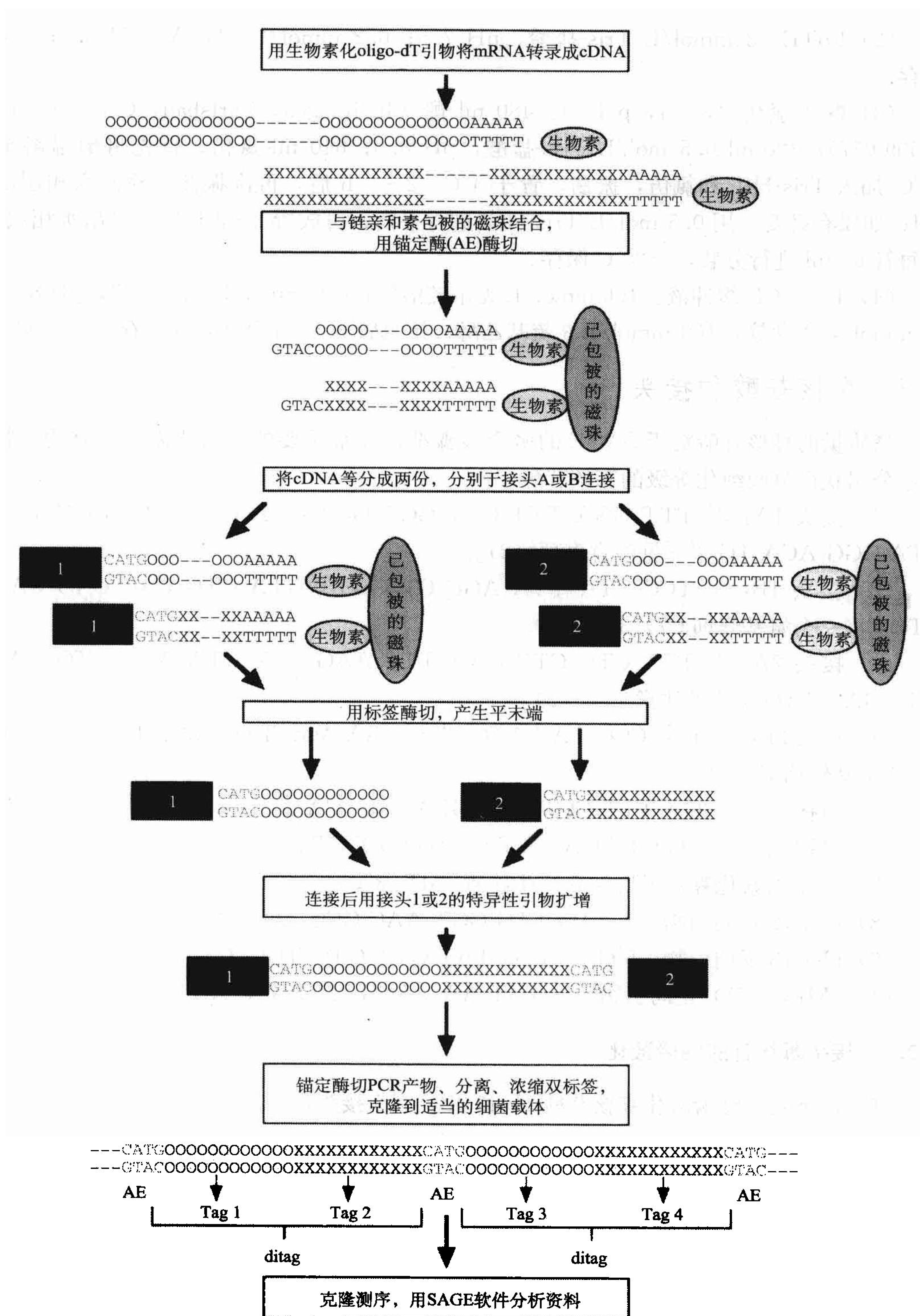


图 37.1 传统 SAGE 方法的流程图

在微量 SAGE 中，cDNA 合成之前已等分 RNA 样本。本图引自文献 [9]，已获得 Blackwell 出版社的允许。

(2) LoTE：3 mmol/L Tris-盐酸，pH 7.5；0.2 mmol/L EDTA，pH 8.0；4°C保存。

(3) 酚：氯仿（3：4，pH 8）：480 ml 酚（Invitrogen，Carlsbad，CA；cat. no. 15509-037）；320 ml 0.5 mol/L Tris-盐酸，pH 8.0；640 ml 氯仿。首先将酚温浴至65°C，加入 Tris-HCl 和氯仿，振荡，置于4°C。2～3 h后，再次振荡，检测水相层的pH；如果有必要，用0.5 mol/L Tris-HCI进行平衡；再放置2～3 h后，吸出水相层，以每管50 ml进行分装，－20°C保存。

(4) 10×PCR缓冲液：166 mmol/L 无水硫酸铵；670 mmol/L Tris-HCl，pH 8.8；67 mmol/L 氯化镁，100 mmol/L β-巯基乙醇；按每管0.5 ml分装，并保存于－20°C。

2.2 寡核苷酸和接头

高质量的寡核苷酸对于SAGE的多个步骤都是非常重要的，因此需要可靠的生物技术公司获得凝胶纯化等级的寡核苷酸。

(1) 接头1A：5′ TTT GGA TTT GCT GGT GCA GTA CAA CTA GGC TTA ATA GGG ACA TG 3′［见注意事项（2)］。

(2) 接头1B：5′ TCC CTA TTA AGC CTA GTT GTA CTG CAC CAG CAA ATC C（一个氨基修饰C7）3′。

(3) 接头2A：5′ TTT CTG CTC GAA TTC AAG CTT CTA ACG ATG TAC GGG GAC ATG 3′［见注意事项（2)］。

(4) 接头2B：5′ TCC CCG TAC ATC GTT AGA AGC TTG AAT TCG AGC AG（一个氨基修饰C7）3′。

(5) 引物1：5′ GGA TTT GCT GGT GCA GTA CA 3′。

(6) 引物2：5′ CTG CTC GAA TTC AAG CTT CT 3′。

(7) 5′生物素化寡聚-dT_{18}：5′［生物素］dT_{18}3′。

(8) pUC18正向引物：5′AAG TTG GGT AAC GCC AGG 3′。

(9) pUC18反向引物：5′GGC TCG TAT GTT GTG TGG 3′。

(10) M13（-21）正向引物：5′ TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3′。

2.2.1 接头寡核苷酸的磷酸化

首先按下列步骤磷酸化寡核苷酸1B和2B，制作接头：

	管1	管2
接头1B（350 ng/μl）	9 μl	—
接头2B（350 ng/μl）	—	9 μl
LoTE	6 μl	6 μl
10×激酶缓冲液（New England Biolabs，Beverly，MA）	2 μl	2 μl
10 mmol/L ATP	2 μl	2 μl
T4多聚核苷酸激酶（10 U/μl）	1 μl	1 μl

充分混合，37°C孵育30 min，然后65℃ 10 min热灭活酶。

2.2.2 磷酸化寡核苷酸退火生成双链 DNA 接头

为了合成双链 DNA 接头，在 0.2 ml PCR 管中加 9 μl 接头 1A（350 ng/μl）到 20 μl磷酸化的接头 1B，以及 9 μl 接头 2A（350 ng/μl）到 20 μl 磷酸化的接头 2B，充分混匀；在 PCR 仪中加热混合物至 95°C 2 min 退火，然后以每秒 0.1℃的速度缓慢降温至 21℃。此时接头的浓度大约为 200 ng/μl。为了校验磷酸化的有效性，每对接头取 200 ng 进行自连接实验，以 20% Novex 凝胶（Invitrogen；cat. no. EC6315）或 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测连接情况。只有自连接效率大于 70%的接头才能够用于 SAGE 实验。

2.3 试剂盒和试剂

2.3.1 传统 SAGE 的试剂盒和试剂

（1）任何商品化的总 RNA 抽提试剂盒，或者用传统的抽提方法[12]［见注意事项（3）］。

（2）任何 mRNA 分离试剂盒（如 Oligotex kit from Qiagen，Hilden，Germany）。

（3）任何 cDNA 合成试剂盒（如 cDNA Synthesis System，Roche，Basel，Switzerland；cat. no. 1117831；或 SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit，Invitrogen；cat. no. 1917-010）。

（4）链亲和素标记的磁珠（Magnetic Dynabeads® M-280 Streptavidin，Dynal，Oslo，Norway；cat. nos. 112.05/06 和 602.10）。

（5）磁铁（Magnet，Dynal MPC®-S，Dynal；cat. no. 120.20）。

（6）限制性内切核酸酶 *Nla*III（New England Biolabs；cat. no. R0125S or R0125L）［见注意事项（4）］。

（7）限制性内切核酸酶 *BsmF*I（New England Biolabs；cat. no. R0580S or R0580L）。

（8）限制性内切核酸酶 *Sph*I（New England Biolabs；cat. no. R0182S or R0182L）。

（9）三磷酸脱氧核苷 dNTP（dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的储备液各 100 mmol/L，混合形成 25 mmol/L dNTP 工作溶液）（Amersham Biosciences，Buckinghamshire，United Kingdom；cat. no. 27-2035-02）。

（10）DNA 聚合酶 I，Klenow 片段（Roche；cat. no. 1008404）。

（11）高浓度 T4 DNA 连接酶（5 U/μl，Invitrogen；cat. no. 15224-041）。

（12）Platinum *Taq* DNA 聚合酶（5 U/μl，Invitrogen；cat. no. 10966-034）。

（13）二甲基亚砜（Sigma Chemicals，St. Louis，MO；cat. no. D2650）。

（14）40%丙烯酰胺-双丙烯酰胺（丙烯酰胺：双丙烯酰胺为 19：1）（Biorad，Hercules，CA；cat. no. 161-0144）。

（15）40%丙烯酰胺-双丙烯酰胺（丙烯酰胺：双丙烯酰胺为 37.5：1）（Bio-Rad；cat. no. 161-0144）。

（16）50×TAE：2 mol/L Tris/乙酸（pH 8），50 mmol/L EDTA。

（17）10%过硫酸铵（APS，Sigma Chemicals；cat. no. A9164）。

(18) 四甲基乙二胺（TEMED，Sigma Chemicals；cat. no. T7024）。

(19) 超级梯度低分子质量标准 20 bp/100 bp（SuperLadder-low 20-bp/100-bp marker，Eurogentec，Seraing，Belgium；cat. no. MW-0312-05）。

(20) 分子质量标准 SmartLadder（SmartLadder，Eurogentec；cat. no. MW-1700-10）。

(21) 荧光染料 SYBR Green I（Molecular Probes，Eugene，OR；cat. no. S-7563）。

(22) Spin-X 微量离心管滤器（Corning Costar，Corning，NY；cat. no. 8160）。

(23) 质粒载体 pUC18（多个供应商供货，可用 *Sph*I 消化 1 μg 载体，琼脂糖凝胶纯化回收，重悬于 TE 缓冲液，终浓度为 25 ng/μl）。

(24) 化学感受态细菌或电转感受态细菌（多家公司出售）。

(25) 测序试剂盒及自动测序仪（多家公司出售）。

(26) 糖原（20 mg/ml，Roche；cat. no. 901393）。

(27) 7.5 mol/L 乙酸铵（Sigma Chemicals；cat. no. A2706）。

(28) 乙醇（分子生物学级别）

2.3.2 微量 SAGE 的试剂

微量 SAGE 是适用于小量总 RNA 样本（如微量活检组织）逐步发展起来的。这就需要一些特殊的试剂来分离表皮与真皮，以及用于从总 RNA 中分离 cDNA 3′端的试剂盒。微量 SAGE 需要链亲和素包被的 0.2 ml 微量离心管，以捕捉生物素标记的 cDNA 末端。需要的试剂如下。

(1) 放线菌素 D（Sigma Chemicals；cat. no. A9415）。

(2) 中性蛋白酶（Roche；cat. no. 0210455）。

(3) mRNA 捕捉试剂盒（Roche；cat. no. 1787896）。

2.4 分析的软件和辅助材料

SAGE 需要特殊的软件以便于自动化分析测序克隆和提取标签。软件的名字为 SAGE2000，可以从 SAGE 的创建者处获得[1]，需要软件副本者可以从 http://www.sagenet.org/处下载，并签署材料转移协议［见注意事项（1）］。

3 方法

3.1 初始材料的准备

本部分介绍分离和收集用于构建 SAGE 文库所需足够的 RNA 的方法。分离 RNA 的方法要依据细胞或者活检材料的来源和数量来选择。获得较纯的 RNA 对于文库的构建至关重要，最好采用可靠的商品化 RNA 提取试剂盒。当然也可以应用传统的方法[12]。

3.1.1 传统 SAGE 初始材料的准备

培养表皮角质形成细胞的方法很多。通常，成功构建每个 SAGE 文库至少需要 8×

10^6 个培养的角质形成细胞。尽管少至 2.5 μg 的多聚腺苷酸化 mRNA 对于传统 SAGE 已经足够，我们仍推荐使用 5～10 μg。传统 SAGE 需要纯化的 mRNA，可采用商品化的纯化试剂盒来纯化总 RNA 和后续的 mRNA。采用分光光度计测定所获取 mRNA 的总量，采用凝胶电泳和 Northern 印迹检查 RNA 的完整性。

3.1.2 微量 SAGE 初始材料的准备

微量 SAGE 可以使用少至 100 ng 的总 RNA（少于 10 ng 的 mRNA），因此可以用皮肤活检物来构建 SAGE 文库。为了获得单纯的表皮，首先需要使表皮与真皮分离。为了最大限度地减少样本中 mRNA 的损失，微量 SAGE 以总 RNA 作为初始材料。由于样本分离后 RNA 量很少，没有必要测定分光光度值。如果 RNA 浓度为已知，总 RNA 用量不要少于 2 μg。如果采用 10 μg 的总 RNA 做初始材料，不需要任何如原创微量 SAGE 方法中所描述的扩增步骤，即可获得良好的结果[8]。

（1）以磷酸盐缓冲盐溶液（pH 7.0，含 0.9 mol/L $CaCl_2$，0.49mol/L $MgCl_2$）漂洗活检的皮肤组织（4 mm）。

（2）用 4 ml 中性蛋白酶溶液（溶解于 PBS，12 mg/ml）4℃孵育活检组织 4 h，中性蛋白酶溶液还含有放线菌素 D（5 μg/ml），目的是阻滞表皮细胞新一轮转录的诱导。

（3）用两把镊子分离表皮和真皮层，并将表皮一分为二。

（4）取其中的一半固定于 3.8%多聚甲醛中用于免疫组化检测，以鉴定分离的正确性［见注意事项（5）］。

（5）另外一半表皮组织用于 RNA 分离，若采用 TRIzol 或 RNAzol 试剂抽提，此时可把表皮冻存于－80℃，此外，可以采用注射器内芯或移液器吸头尽可能多地施以机械力来压碎表皮。

（6）应用所选择的 RNA 抽提方法进行 RNA 提取。

（7）沉淀后按照制造商的使用说明书，重悬总 RNA 于 40 μl 裂解缓冲液（mRNA 捕捉试剂盒）中。

（8）等分总 RNA 样本：用两个 0.2 ml 的离心管，每管 20 μl 平分样本 RNA（分别与接头 1 和接头 2 进行连接），然后进行 cDNA 的合成（见 3.2.2）。

3.2 cDNA 合成

尽管传统 SAGE 和微量 SAGE 在 cDNA 合成的体积上不同，cDNA 的纯化方法完全有别，但是两者的 cDNA 合成在本质上是一致的。

3.2.1 传统 SAGE 的 cDNA 合成

采用商品化的 cDNA 合成试剂盒，按照说明书操作。以约 5 μg 的多聚腺苷酸化 mRNA 为模板，采用 2.5 μg 生物素化寡聚-dT_{18}（见 2.2）来引导 cDNA 合成。根据所用 RNA 的量调整反应体系的体积，应用琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 的质量。第二链合成后，纯化回收 DNA 的步骤如下。

（1）以 LoTE 缓冲液补足反应体系到 200 μl。

（2）加入等体积的酚∶氯仿（3∶4，pH 8.0）抽提 DNA：涡旋混合数秒钟，在微

量离心机中以最大速度离心 2 min，然后转移水相层到一个新的 1.5 ml 微量离心管中。

(3) 沉淀 DNA：200 μl 样品中加入 1 μl 糖原［见注意事项（6）］和 133 μl 7.5 mol/L 乙酸铵，充分混匀；加入 777 μl 100%乙醇。

(4) 最大速度 4℃离心 10 min。

(5) 采用 1 ml 冰冷的 70%乙醇漂洗沉淀两次，最大速度 4°C 离心。

(6) 真空离心蒸发浓缩器（SpeedVac）中吸干 DNA 沉淀，以 20 μl LoTE 重悬沉淀。

3.2.2 微量 SAGE 的 cDNA 合成

对于微量 SAGE 而言，使用的大多数试剂来源于 mRNA 捕捉试剂盒，该试剂盒专为从小量总 RNA 中捕捉 mRNA 而设计，使用前仔细阅读试剂盒的说明书。

(1) 两个 0.2 ml 离心管中均盛有 20 μl 含 RNA 的溶解缓冲液，每管加入 4 μl 生物素化寡聚-dT_{20}（试剂盒提供，5 pmol/μl），用移液器吹吸混匀。

(2) 37°C 孵育 5 min，最好在 PCR 仪中进行。

(3) 转移混合物到链亲和素包被的 0.2 ml 离心管中（mRNA 捕捉试剂盒提供）。

(4) 37°C 孵育 3 min，最好在 PCR 仪中进行。

(5) 以 mRNA 捕捉试剂盒提供的漂洗缓冲液 100 μl 洗涤已捕捉到的 mRNA3 次，用移液器缓慢上下吹吸 3～5 次，小心定量移除漂洗缓冲液，因此时经退火结合到生物素化寡聚-dT_{18}的 mRNA 已贴附在链亲和素包被的 0.2 ml 离心管壁上。

(6) 选用试剂盒合成 cDNA，第一链合成采用 20 μl 体积，第二链合成采用 100μl 的最大体积，推荐使用 PCR 仪，cDNA 可以冻存于－20°C 直到使用。

(7) cDNA 合成后，去除反应缓冲液，用 mRNA 捕捉试剂盒提供的漂洗缓冲液 100 μl 小心洗涤 cDNA3 次，并立即进行下步的 *Nla*III 酶切消化反应（见 3.3.2)。

3.3 cDNA 的 *Nla*III 酶切消化［见注意事项（7）］

在本步骤中，用锚定酶 *Nla*III 消化 3′生物素化的 cDNA，生成的 3′端生物素化的 cDNA 可以被磁珠捕捉（传统 SAGE），或者吸附于链亲和素包被的 0.2 ml 离心管壁（微量 SAGE）。很显然，这些 cDNA 末端的特征是在其 5′端存在 3′ *Nla*III 的限制性酶切位点，因此这一 *Nla*III 识别序列将被用来作为 SAGE 文库分析检验的锚定序列。

3.3.1 传统 SAGE 中用 *Nla*III 对 cDNA 进行酶切消化

(1) 将下列成分混合并在 37°C 温育 1 h：10 μl cDNA（样本的一半）；163 μl LoTE；2 μl 100×牛血清白蛋白（BSA)；20 μl 10×*Nla*III 缓冲液（商品化 *Nla*III 限制酶配有 100×BSA 和 10×*Nla*III 缓冲液）；5 μl *Nla*III（10 U/μl)。

(2) 用酚∶氯仿抽提取 cDNA，并沉淀（见 3.2.1 所述)。

(3) 用 20 μl LoTE 重悬 cDNA 沉淀，把已消化的 DNA（cDNA 3′端仍然需要从片段混合物中捕捉出来，按 3.4 所述步骤进行后续操作）保持在冰上以防止变性或－20°C 保存直至使用。

3.3.2 微量 SAGE 中用 *Nla*III 对 cDNA 进行酶切消化

（1）用含有 1×BSA 的 100 μl 1×*Nla*III 缓冲液，仔细洗涤吸附于 0.2 ml 链亲和素包被离心管壁上的 cDNA，共洗涤 3 次，每次用移液器缓慢上下吹吸 3～5 次。

（2）将已吸附的 cDNA 与 20 U *Nla*III（溶于 1×*Nla*III 缓冲液，该缓冲液含有 1×BSA），于 37℃温育 1 h，酶切反应的体积为 25 μl。

（3）去除消化缓冲液，以 mRNA 捕获试剂盒提供的 100 μl 漂洗缓冲液洗涤仍吸附于管壁的 cDNA 3′端（此时的 cDNA 3′端即可用于与接头 1 和接头 2 的连接，按 3.5.2 所述步骤进行后续操作），洗涤 3 次，并立即进入下一步操作。

3.4 应用链亲和素包被的磁珠捕获 cDNA 3′端

在传统 SAGE 中，必须分离出去除 5′端的 cDNA 序列，再由 3′端来进行富集，并经 *Nla*III 酶切产生带有悬垂碱基的 5′端。在此步操作中，所用的链亲和素包被磁珠可被磁铁吸附。

（1）向两个 1.5 ml 微量离心管内各加入 100 μl 链亲和素包被的磁珠（一管用来从 3′端分离 cDNA，并在 5′端连接接头 1；另一管用来从 3′端分离 cDNA，并在 5′端连接接头 2）。

（2）用磁铁固定磁珠浆。

（3）去上清，加入 200 μl 1×B+W 缓冲液。

（4）混匀，用磁铁固定磁珠，去除缓冲液。

（5）每管加入 100 μl 2×B+W 缓冲液、90 μl 去离子水和 10 μl cDNA。

（6）室温温育 15 min，每隔几分钟进行混悬，以利于 cDNA 与磁珠的充分结合。

（7）洗涤以磁铁制动的磁珠，去上清，加入 200 μl 1×B+W 缓冲液，混匀。

（8）再洗涤磁珠两次。

（9）以 200 μl LoTE 洗涤磁珠两次。

（10）立即与接头进行连接反应。

3.5 cDNA 与接头 1 和接头 2 的连接

接头 1 和 2 分别含有引物 1 和 2 的退火位点，而且含有 IIS 型限制酶 *Bsm*F1 的识别位点。*Bsm*F1 可以酶切双链 cDNA，切点在其识别位点下游 10～14 bp，产生对应于特定基因转录物的独特标签，因此这种酶被称为标签酶。接头的 3′端也含有一悬垂序列可与 *Nla*III 作用于 cDNA 产生的 5′端悬垂序列互相连接。

3.5.1 传统 SAGE 的接头连接

cDNA 样本在与磁珠结合之前已经平分成两个样本，一个用来连接接头 1，一个用来连接接头 2。

（1）向每个微量离心管中加入下列试剂：25 μl LoTE；5 μl 接头（200 ng/μl；接头 1 和接头 2 各加入一管）；8 μl 5×连接酶缓冲液（商品化试剂盒提供，见试剂部分的 2.3.1）。

(2) 充分混匀，并温热至 50°C 2 min，冷却至室温 15 min。

(3) 每一样本中加入 2 μl T4 DNA 连接酶（5U/μl），以移液器上下吹吸混匀。

(4) 16℃孵育 2 h，间断轻柔混匀，使接头与 cDNA 末端充分连接。

(5) 如前所述用磁铁吸附磁珠，以 1 ml 1× B+W 缓冲液洗涤样本 4 次，然后用标签酶进行接头-cDNA 分子的酶切消化。

3.5.2 微量 SAGE 的接头连接

(1) 用 100 μl 1×连接酶缓冲液洗涤吸附于 0.2ml 离心管壁的 cDNA 三次，然后向每管加入 1.25 μl 接头（200 ng/μl，接头 1 加入一管，接头 2 加入另外一管）、5 μl 5×连接酶缓冲液和 16.75 μl LoTE。

(2) 以移液器上下吹吸混匀。

(3) 在 PCR 仪内，样本于 50°C 加热 2 min，缓慢冷却（0.1°C/s）至室温。

(4) 加 2 μl T4 DNA 连接酶，置于 PCR 仪内，16°C 孵育 2 h。千万勿用加热盖。

(5) 定量地移除连接混合物。

(6) 以 mRNA 捕捉试剂盒内的洗涤缓冲液洗涤吸附于管壁的接头-cDNA 分子三次。

(7) 进行接头-cDNA 分子的标签酶酶切消化，生成独特的标签。

3.6 用标签酶 *Bsm*FI 消化，释放 cDNA 标签［见注意事项（8）］

本步骤中，标签酶 *Bsm*FI 消化接头-cDNA 分子产生 cDNA 标签。*Bsm*FI 的识别位点位于接头部分，在其识别位点下游 10～14 bp 处切割双链 cDNA，形成 cDNA 标签。

3.6.1 传统 SAGE 中 cDNA 标签的释放

(1) 充分洗涤吸附于磁珠上的接头-cDNA 分子后，向盛有磁珠的微量离心管内加入 86 μl LoTE；10 μl 10×*Bsm*FI 缓冲液（与酶一起提供）；2 μl 100×BSA（与酶一起提供）；2 μl *Bsm*FI（2 U/μl）。

(2) 混匀，65°C 孵育 2 h；间断混匀以使磁珠悬浮，以利于 cDNA 标签的有效释放。

(3) 加入 100 μl LoTE，用等量的酚：氯仿（3：4，pH 8）抽提样品 DNA。

(4) 转移水相（200 μl）到一个新离心管，加入 133 μl 7.5 mol/L 乙酸铵和 1 μl 糖原，混匀后沉淀 DNA，加入 1000 μl 冰冷的乙醇，充分混匀。

(5) 以最高转速 4°C 离心 30 min。

(6) 用 1 ml 冰冷的 70% 乙醇洗涤沉淀两次。

(7) 晾干 DNA 沉淀，每个沉淀用 10 μl LoTE 重悬，放置冰上或储存于－20°C。

3.6.2 微量 SAGE cDNA 标签的释放

(1) 用 100 μl 1×*Bsm*FI 消化缓冲液，洗涤贴附于 0.2 cm 离心管壁的接头-cDNA 分子 2～3 次。

(2) 使用含酶的储备缓冲液配制含有 2 U *Bsm*FI 的 1×*Bsm*FI 消化缓冲液，每管加

入 25 μl。

(3) 在 PCR 仪中 65°C 孵育反应 1 h，尽可能使用带盖（已加热至 65°C）的 PCR 仪，以避免消化混合物的过多蒸发。

(4) 消化完成后，转移全部已含 cDNA 标签的混合物至 1.5 ml 微量离心管中。

(5) 以 LoTE 缓冲液将每个样本补足到 200 μl。

(6) 以等体积的酚：氯仿（3：4，pH 8）抽提样本一次，4°C 离心 2 min。转移水相层到一个新的 1.5 ml 离心管。

(7) 向 200 μl 样本中加入 133 μl 7.5 mol/L 乙酸铵和 1 μl 糖原；吹吸混匀后，加入 777 μl 冰冷乙醇充分混匀。

(8) 4°C 离心 30 min，沉淀 cDNA 标签。

(9) 用 1 ml 冰冷的 70%乙醇洗涤样本两次。

(10) 干燥沉淀，以 10 μl LoTE 重悬，置于冰上，并进入下一步操作或储存于−20℃。

3.7 生成平末端的 cDNA 标签

这一步骤在传统 SAGE 和微量 SAGE 是一致的。

(1) 每个样本管加入以下试剂，终体积为 50 μl：10 μl 5×第二链缓冲液（由 cDNA 合成试剂盒提供）；1 μl 100×BSA（由 *Nla*III 和 *Bsm*FI 包装盒内提供）；1 μl 25 mmol/L dNTP；26.5 μl 去离子水；1.5 μl Klenow 聚合酶（2 U/μl）。轻柔地充分混匀。

(2) 37°C 温育反应 30 min。

(3) 以 LoTE 缓冲液增加体积到 200 μl。

(4) 以等体积的酚：氯仿（3：4，pH 8）抽提样本一次。

(5) 沉淀平末端核酸片段：加入 133 μl 7.5 mol/L 乙酸铵和 1 μl 糖原，吹吸混匀后，加入 1000 μl 冰冷的乙醇充分混匀。

(6) 最大速度，4°C 离心 30 min 以沉降 cDNA。

(7) 用 1 ml 冰冷的 70%乙醇洗涤样本沉淀两次。

(8) 干燥沉淀后，分别以 6 μl LoTE（传统 SAGE）或 4 μl LoTE（微量 SAGE）重悬沉淀。

3.8 连接 cDNA 标签，形成双标签

本步骤中，接头-cDNA 标签分子组合产生的分子带有两个酶切标签，每个标签对应着一个独特的转录物，其两侧翼为接头 1 和接头 2。所产生的连接产物，或者说双标签（ditags）将作为 PCR 模板，用两个接头特异性的引物进行扩增反应。

传统 SAGE 的操作步骤如下。

(1) 在一个微量离心管内混合 2 μl 接头 1-cDNA 和 2 μl 接头 2-cDNA。

(2) 加 1.2 μl 5×连接酶缓冲液，混匀。

(3) 加 0.8 μl T4 DNA 连接酶（5 U/μl），轻轻混匀。

(4) 16°C 孵育过夜。

(5) 以 LoTE 补足体积至 20 μl，再进行下一步。

需要同时设置阴性对照，即“无连接酶的对照”，同样进行 PCR 扩增。在微量

SAGE 中，收集全部接头-cDNA 分子用于连接反应，同时必须设置阴性对照以排除样本被其他来源的 102 bp DNA 片段污染的可能性。在接头-标签混合物（总体积 8 μl）中加入 2.2 μl 5×连接酶缓冲液、0.8 μl T4 DNA 连接酶（5 U/μl），其余步骤按照传统 SAGE 进行。

3.9 采用接头特异性引物扩增双标签

应用引物 1 和引物 2（见 2.2）扩增双标签。采用不同稀释度的模板（从 1∶10 到 1∶1000稀释连接产物）及不同的扩增循环数（采用 26、28 和 30 个循环）进行扩增，以优化 PCR 条件。

（1）向 0.2 ml PCR 管中加入总体积 50 μl 的下列试剂：5 μl 10× PCR 缓冲液（见 2.1.）；3 μl 二甲基亚砜；3 μl 25 mmol/L dNTP［见注意事项（9）］；1 μl 引物 1（350 ng/μl）；1 μl 引物 2（350 ng/μl）；35 μl 去离子水；1 μl Platinum *Taq* 聚合酶（5 U/μl）［见注意事项（10）］；1 μl 连接产物（不同稀释度）。

（2）PCR 反应条件如下：升、降温速度控制为 1℃/s。95℃ 孵育 4 min；然后 95℃ 30 s，55℃ 1 min，66℃ 1 min，共进行 26、28 和 30 个循环；66℃ 延伸 5 min；降温至 4℃ 结束。

（3）10 μl PCR 产物行 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳（丙烯酰胺∶双丙烯酰胺为 19∶1，溶于 1×TAE）分析：每 35 ml 凝胶（Bio-Rad 蛋白电泳系统的需要量）用 10.5 ml 聚丙烯酰胺（见 2.3.1）、23.5 ml 去离子水、700 μl 50×TAE、350 μl 10%过硫酸铵和 35 μl TMED 配制。上述体积可根据所选择的凝聚体系进行调整，用标准上样缓冲液[12]，采用 SuperLadder 20/100 bp 低分子质量标准；扩增的双标签位于 102 bp；80 bp 处可能有背景条带。

如果产量太少，增加循环数到 28，但是务求背景不要太高［见注意事项（11）］。为了分离双标签，采用获得最多 102 bp 双标签产物而背景最低的连接混合物稀释度。采用产生最多双标签的 PCR 参数和最佳的稀释度进行大规模的 PCR 扩增，同时扩增 2～3 个 96 孔板。

3.10 分离双标签

尽管大规模扩增的 PCR 产物可以等量分装到多个微量离心管，但是建议用单个 50 ml离心管收集 PCR 产物，以便提高酚抽提的速度。

（1）把大规模扩增的 PCR 产物混合于一个 50 ml 离心管中（约 15 ml）。

（2）用等体积的酚∶氯仿（3∶4，pH 8）抽提 DNA，4℃ 以 4000 *g* 离心 10 min。

（3）将水相上清（约 13.5 ml）以 500 μl 每管等量分装于 2 ml 的离心管中，每管加入 165 μl 7.5 mol/L 乙酸铵和 2 μl 糖原，混合均匀，再加入 1500 μl 冰冷的乙醇。

（4）4℃ 最大速度离心 30 min，沉降 DNA。

（5）用冰冷 70%乙醇洗涤沉淀三次，每次洗涤之间 4℃离心 5 min。

（6）以总体积 243 μl 的 LoTE 重新悬浮沉淀。

（7）估算回收的 DNA 量[13]：首先，对一已知浓度的纯化 DNA 进行系列稀释，其浓度为 0、1 ng/μl、2.5 ng/μl、5 ng/μl、7.5 ng/μl、10 ng/μl 和 20 ng/μl；然后稀释

样本 DNA，其稀释度为 1/5、1/25 和 1/125。将 4 μl 上述各浓度的标准品或 4 μl 不同稀释度的样品与 4 μl 溴化乙锭（1 μg/ml）混合均匀，每 8 μl 混合液点样于石蜡封口膜或塑料薄膜上，在紫外光透照灯下照相，估计样本中的 DNA 浓度。本步骤所测得的回收 DNA 应为 60～100 μg。

（8）加入 27 μl 10×DNA 上样缓冲液[12]，采用 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳（丙烯酰胺：双丙烯酰胺为 19：1，溶于 1×TAE），根据所用的凝胶系统每个泳道上样 10～20 μl,同时使用 SuperLadder 20/100-bp 低分子质量标准。

（9）电泳后，用 SYBR Green I（1：10 000 稀释于 1×TAE）室温染色 15 min。

（10）用带有 SYBR Green 滤光片的紫外透照仪或者带琥珀屏的荧光透射仪显示 DNA 条带［见注意事项（12）］。

（11）用刀片切下扩增的双标签胶条，取 2～3 片凝胶条放入 0.5 ml 离心管，该管底已用 21 号针头扎一小孔。

（12）把已扎孔的 0.5 ml 离心管放入 2 ml 离心管内，最大速度离心 2min，如此可使切下的凝胶碾碎。

（13）去除 0.5 ml 离心管，在碎凝胶中加入 250 μl LoTE 和 50 μl 7.5 mol/L 乙酸铵；涡旋振荡混匀，65℃孵育 15 min。

（14）把每一 2 ml 离心管的内容物转移到预先用 5 μl LoTE 浸湿的 Spin-X 微量离心管滤器上。

（15）将 Spin-X 管以最大速度离心 5 min。

（16）转移洗脱液到新的 2 ml 微量离心管，加入 2 μl 糖原和 133 μl 7.5 mol/L 乙酸铵，充分混匀，再加入 1000 μl 冰冷乙醇。

（17）于 4°C 以最大速度离心 15 min，以沉淀 DNA。

（18）70%冰乙醇洗涤三次沉淀，移去乙醇，空气中晾干。

（19）再用总体积为 162 μl 的 LoTE 液溶解所有的沉淀。

（20）估算 DNA 回收量，产量应为 10～20 μg。

（21）加入 200 U *Nla*III（溶于 200 μl 1×*Nla*III 缓冲液）消化 PCR 产物，37°C 孵育 1 h。

（22）用等体积的酚：氯仿（3：4，pH 8）抽提消化混合物，加入 67 μl 7.5 mol/L 乙酸铵和 3 μl 糖原，充分混匀，再加入 733 μl100%的冰乙醇。

（23）混匀，于－80°C 至少 10 min 以沉淀 DNA。

（24）4℃，最大速度离心 15 min。

（25）70%乙醇洗涤，空气中干燥 DNA 沉淀。

（26）用 36 μl 含有 5 mmol/L 氯化镁的 LoTE 重悬 DNA［见注意事项（13）］。

（27）加入 4 μl 10×加样缓冲液，分 4 个泳道（每个泳道 10 μl）在 12%聚丙烯酰胺凝胶（丙烯酰胺：双丙烯酰胺为 19：1，溶于 1×TAE）电泳，同时加入 SuperLadder 20/100 bp 低分子质量标准。

（28）电泳后，以前述方法对凝胶进行 SYBR Green 染色，切下 24～26 bp 片段的凝胶。

（29）合并两片凝胶于一个 0.5 ml 离心管中，离心管预先采用 21 号针头在底部扎

一小孔。将 0.5 ml 离心管置于 2 ml 离心管内。

（30）最大速度离心 4 min。

（31）向每个 2 ml 离心管内加入 300 μl 含 5 mmol/L 氯化镁的 LoTE，涡旋振荡混匀，37℃孵育 15 min。

（32）以 Spin-X 微量离心管滤过器将含有 DNA 的溶液与凝胶分离，方法如前所述，4℃离心。

（33）转移洗脱液到 3 个 1.5 ml 微量离心管（每管 200 μl），加入 67 μl 7.5 mol/L 乙酸铵和 2 μl 糖原，充分混匀，再加入 733 μl 100%的冰乙醇沉淀双标签 DNA。

（34）－80℃ 至少孵育 10 min。

（35）最大速度离心 15 min，4℃。

（36）70%乙醇洗涤 DNA 沉淀三次。

（37）以 10 μl 1×连接缓冲液重悬。

（38）估算双标签 DNA 的含量：取样本 1 μl 进行系列稀释，产量应为数百纳克。

3.11 双标签连接形成多联体

多联体是一系列相似实体的有序连接形成的链。在 SAGE 中，双标签连接形成一系列有序的双标签链，双标签之间隔以 *Nla*III 酶切位点。这个位点可以用来确定标签的正确方向，并成为相邻两个双标签之间的界限。

（1）取 1 μl T4 DNA 连接酶（5 U/μl）加入到 9 μl 双标签中。

（2）16℃连接 30 min～2 h。

（3）加 1 μl 10×上样缓冲液，加样于 1×TAE 配制的 8%聚丙烯酰胺凝胶（丙烯酰胺：双丙烯酰胺为 39.5：1）的一个泳道，旁边的泳道加入 SuperLadder 20/100 bp 低分子质量标准。

（4）根据操作说明书，电泳数小时。

（5）电泳后，用 SYBR Green I（1：10 000 稀释于 1×TAE）室温染色 15 min。

（6）紫外透照仪或者荧光透射仪显示 DNA 条带，多联体将出现几百到几千 bp 的弥散区域。

（7）将 500～1000 bp 和 1000～2500 bp 的弥散条带凝胶切下。

（8）将切下的凝胶放入 0.5 ml 离心管中，离心管预先采用 21 号针头在底部扎一小孔。将 0.5 ml 离心管置于 2 ml 离心管内。

（9）以最大速度离心 5 min。

（10）去除 0.5 ml 离心管，在盛有凝胶泥的 2 ml 离心管内加入 300 μl 含 5 mmol/L 氯化镁的 LoTE。

（11）涡旋振荡混匀，65℃孵育 15 min。

（12）把每个 2 ml 离心管的内容物转移到两个 Spin-X 微量离心管滤器，全速离心 5 min。

（13）从两个 Spin-X 微量离心管中将含有多联体的洗脱液吸出，合并于一个 1.5 ml 微量离心管中。

(14) 沉淀大约 300 μl 洗脱液内的多联体：加入 133 μl 7.5 mol/L 乙酸铵和 1 μl 糖原，充分混匀，再加入 1000 μl100%的冰乙醇。

(15) 最大速度 4°C 离心 15 min。

(16) 70%冰冷乙醇洗涤 DNA 沉淀 2～3 次。

(17) 空气中自然干燥 DNA 沉淀，重悬于 5 μl LoTE。

3.12 将多联体克隆到 pUC18 载体 [见注意事项 (14)]

将小片段（500～1000 bp）和大片段（1000～2500 bp）的多联体克隆入 pUC18 载体，分别按下列步骤进行操作。

(1) 在冰上配制下列混合液：5 μl 纯化的多联体，1 μl pUC18 载体（25 ng/μl，已用 *Sph*I 限制酶消化过），2 μl 5× 连接酶缓冲液，1 μl 去离子水。吹吸混匀，再加入 1 μl T4 DNA 连接酶（5 U/μl）。缓慢上下吹吸混匀连接酶，16℃孵育 2 h 或过夜。

(2) 可选择步骤：纯化连接产物的方法是用 LoTE 缓冲液增加连接反应的体积到 200 μl，以酚：氯仿抽提后乙醇沉淀；按照感受态细菌供应商的推荐方法，以适当的体积重新溶解 DNA 沉淀，用于电转化或化学转化。

(3) 按照说明书的方法，以 1～2 μl 连接反应物进行热激转化或电穿孔。

(4) 按照供应商推荐的方法，以 1/10 和 1/100 的所得转化物混合液铺种于含有 1 mmol/L异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）、50 μg/ml X-Gal 和 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂板（直径 10 cm）[12]，剩余的转化混合物储存于 4℃不超过一个夜晚。

(5) 在次日将剩余的转化菌液混合物铺板之前，首先用 96 个菌落的菌落 PCR 方法估计插入物的长度（方法见下一节，80%以上的 PCR 产物将是 600 bp 或者更长的片段）。建立中等大小（约 25 000 个标签）的标签库，需要的菌落总数应在 1000～1500 个的范围。如需要更大的标签库，仅需要增加转化次数，获得更多的菌落即可。由大的标签多联体形成的菌落数可能相对较少，但还是能提供非常大的插入片段，这些片段可以通过双向测序进行鉴定。

3.13 转化细菌的克隆 PCR

本步骤中，对应于 pUC18 载体多克隆位点两侧翼的引物用来 PCR 扩增，其 PCR 产物为含有侧翼载体序列的约 185 bp 大小的片段。

(1) 从 LB 琼脂板上挑取菌落，涂在 96 孔 PCR 板的 0.2 ml PCR 管壁或管底。如果可能在后续步骤中使用多通道的加样器，可以加快 PCR 的准备和 PCR 产物的提纯。

(2) 配制 PCR 混合物，从中等量分装 25 μl 到每一含有细菌的 PCR 管。每 25 μl 反应体系的成分是：2.5 μl 10× Platinum *Taq* PCR 缓冲液（与酶一起提供）；1.5 μl 25 mmol/L氯化镁；2.5 μl 2 mmol/L dNTP；2.5 μl 2.5 μmol/L 引物 pUC18-F；2.5 μl 2.5 μmol/L 引物 pUC18-R；0.2 μl Platinum *Taq* 聚合酶（5 U/μl）；13.3 μl 去离子水。

(3) 菌落 PCR 的反应程序如下：94°C 4 min 一个循环；94°C 1 min、54°C 1 min 和 72°C 1.5 min，共 35 个循环；72°C 10 min 一个循环；至 4°C 结束。

(4) 然后提纯每个菌落 PCR 的产物：向每 25 μl PCR 反应体系中加入 42 μl TE

(pH 7.5)、3 μl 糖原和 20 μl 7.5 mol/L 乙酸铵 [见注意事项 (15)]；充分混合，应用可以对 96 孔平板进行离心的离心机短暂离心，然后加入 60 μl 100%乙醇 [见注意事项 (16)]。

(5) 混匀后置于冰上 30 min。

(6) 4℃，2500 *g* 离心 45 min。

(7) 小心地去除 96 孔平板的盖子，防止反应液从一个孔溅入别的孔。

(8) 倒掉上清液，即翻转平板扣在纸巾上。

(9) 将平板倒扣在相同大小的 3 层 Whatman 3MM 滤纸上，于 4℃ 160 *g* 离心 3 min，以去除残留的乙醇。

(10) 每孔加入 150 μl 70%乙醇，洗涤沉淀两次，按上述方法去除上清液。

(11) 空气中干燥沉淀 10 min，然后以 25 μl LoTE 或 TE 重悬。

(12) 取 5 μl PCR 产物，加样于 1×TAE 配制的 1%琼脂糖凝胶电泳，旁边采用 Smartladder DNA 分子质量标准。

(13) 估计 PCR 产物的产量，剩余的 PCR 产物冻存于－20℃。

(14) 大于 600 bp 的 PCR 产物适合于测序 [见注意事项 (17)]。

3.14 测序以及测序结果的分析

可以使用任何适用于自动测序仪（如 ABI3100/3700/3730 或 LiCor 测序仪）的测序试剂盒，严格按照说明书进行测序。对于 pUC18 系列载体，采用 M13 (-21) 正向引物。也可以从两侧对克隆进行测序，但这将使测序成本加倍，同时几乎得不到多少额外信息。在进行测序分析和标签提取之前，建议去除载体序列。这通常可以由自动测序仪提供的软件完成。

应用 SAGE 软件包进行标签序列的提取，签订物品传递协议后，可以在网站 http：//www.sagenet.org/免费下载该软件包 [见注意事项 (1)]。该软件不仅能够提取标签序列，也可以对不同标签文库进行比较，因此能够鉴定出在不同条件或疾病情况下的差异性调节基因。该软件也去除污染的接头序列和因 PCR 偏倚产生的二聚体序列。其他的 SAGE 文库公开发布于美国国立生物信息中心（NCBI）的 Gene Expression Omnibus 网站（见 http：// www.ncbi.nlm.nih.gov/GEO/）和 SAGE 档案（见 http：//www.ncbi.nlm.nih.gov/ SAGE/），以及目前最可靠的 SAGE 文库分析和提交网站 SAGEGenie（见 http：//cgap.nci.nih.gov/SAGE)。这些开放的数据很容易与研究者自己的数据进行整合分析。

4 注意事项

(1) 对于科研人员来说，SAGE 操作流程和关于它的变动信息在网站 http：//www.sagenet.org/是完全免费的；对出于商业目的应用 SAGE 者应联系 Genzyme molecular oncology (http：//www.genzyme.com/)；而且，Invitrogen 公司也商品化了 I-SAGE 试剂盒，详见 http：//www.invitrogen.com/。

(2) 可以订购 5′端生物素化的接头 1A 和接头 2A，便于标签酶消化后去除接头，

以及去除最终文库的接头污染。这种清除的方法在文献中也有描述[14]。

（3）尽管也可以使用传统的 RNA 提取方法，但是为了减少文库的污染，推荐使用商品化的 RNA 提取试剂盒。

（4）限制性内切核酸酶 *Nla*III 应该储存于－70～－80°C，到货后即应分装，因为该酶在－20℃不是很稳定，且对反复冻融很敏感。

（5）分离表皮的完整性可以使用细胞角蛋白 5 的免疫组织化学染色方法来检测。细胞角蛋白 5 表达于表皮基底层，如果分离过程损伤了基底层（如部分缺失），基底层的一部分将仍贴附于下面的真皮层。如果真是这种情况，不要进行微量 SAGE。为了检测活检组织用中性蛋白酶消化过程中是否存在可能的 RNA 降解，可以采用 Northern 印迹进行鉴定，取机体同一部位皮肤的整个 4 mm 活检物和从 4 mm 活检物中分离出的完整表皮，观察细胞角蛋白 5 和细胞角蛋白 10 的 mRNA 表达水平及其比率是否没有变化。如果其表达水平和比率没有变化，可以进行下一步实验。

（6）尽管糖原对于连接、消化和扩增的影响很小，应该意识到，相同的样本不经过凝胶纯化而进行沉淀反应会导致糖原在样本中不断累积。为了更好地连接和消化，应将糖原浓度控制得尽可能地低，在消化和连接反应中，糖原的浓度不宜超过 7 μg/μl。

（7）锚定酶 *Nla*III 可以用其他能够产生悬垂末端碱基的内切酶代替，只要替代的酶仅识别 4 个碱基对，理论上每 256 bp 的 cDNA 上就有一个酶切位点。注意：为适应其他锚定酶的消化，接头的序列应做适当调整。

（8）标签酶 *Bsm*FI 也可以用 *Fok*I 或 *Mme*I 代替（后者产生标签约 17 bp，可用于 LongSAGE，具体参见 http：//www. sagenet. org/），注意为适应其他标签酶的消化，接头序列应做适当调整。

（9）由于 dNTP 和引物的浓度相对较高，实际上可能抑制接头-双标签的扩增，为增加扩增产量和降低背景，有必要适当优化二者的浓度。

（10）Platinum *Taq* 聚合酶是允许热启动 PCR 的一种酶，意味着可以在实验室工作台上安全地准备 PCR，只有样本在 95℃加热 3 min 以上，PCR 反应才会启动。

（11）最好立即检测 26、28、30 个循环后双标签的产量，然后进行规模化扩增。

（12）尽管也可以采用溴化乙锭对凝胶进行染色，但由于紫外光照射可以损伤 DNA，建议采用 SYBR Green 1 与荧光透射仪和合适的屏蔽罩联合使用。

（13）为防止双标签的变性，可加入氯化镁增加样本中的含盐量，并尽可能把双标签保持在冰上进行操作。

（14）任何合适的测序载体都可以应用于 SAGE 的测序，但是注意需要使用不同的引物进行菌落 PCR 和测序。采用 pZero-1 载体便于克隆筛选，克隆效率也高，因为克隆到该载体的多联体破坏了一个自杀基因，导致非常低的背景。

（15）当进行较大量的沉淀反应时，可以配制 TE、糖原和乙酸铵的混合液，每个菌落 PCR 中加入 65 μl 此混合液，然后混匀样本，短暂离心，再按照流程加入乙醇。

（16）菌落 PCR 产物用仅为 40%的乙醇进行沉淀，这样几乎可以完全防止核苷酸和引物的共沉淀，后两者会给后续的测序反应带来负面影响。

（17）值得一提的是，应用 pUC18 载体、pUC18-F 和 pUC18-R 为引物进行菌落 PCR，PCR 产物的两端将含有总计 185 bp 的载体序列。这意味着一个 600 bp 的 PCR

产物含有稍多于 400 bp 的多联体序列，对应于大致 14 个双标签，即约 28 个标签或转录物。

（苏踊跃 译　罗向东 校）

参考文献

[1] Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484—487.

[2] Caron, H., van Schaik, B., van der Mee, M., et al. (2001) The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science* **291**, 1289—1292.

[3] Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., et al. (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G_2/M progression. *Mol. Cell.* **1**, 3—11.

[4] Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300—305.

[5] Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., et al. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**, 243—251.

[6] Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., et al. (1997) Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* **276**, 1268—1272.

[7] Zhou, W., Sokoll, L. J., Bruzek, D. J., et al. (1998) Identifying markers for pancreatic cancer by gene expression analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**, 109—112.

[8] Datson, N. A., van der Perk-de Jong, J., van den Berg, M. P., de Kloet, E. R., and Vreugdenhil, E. (1999) MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1300—1307.

[9] Jansen, B. J. H., van Ruissen, F., de Jongh, G. J., Zeeuwen, P. L. J. M., and Schalkwijk, J. (2001) Serial analysis of gene expression in differentiated cultures of human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 12—22.

[10] van Ruissen, F., Jansen, B. J. H., de Jongh, G. J., Zeeuwen, P. L. J. M., and Schalkwijk, J. (2002) A partial transcriptome of human epidermis. *Genomics* **79**, 67 1—678.

[11] van Ruissen, F., Jansen, B. J. H., de Jongh, G. J., van Vlijmen-Willems, I. M., and Schalkwijk, J. (2002) Differential gene expression in premalignant human epidermis revealed by cluster analysis of serial analysis of gene expression (SAGE) libraries. *FASEB J.* **16**, 246—248.

[12] Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[13] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., and Struhl, K., eds. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.

[14] Powell, J. (1998) Enhanced concatemer cloning-a modification to the SAGE (serial analy sis of gene expression) technique. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3445—3446.

第 38 章 DermArray®尼龙膜 DNA 微阵列应用于皮肤病基因表达谱的研究方法

Richard L. Davis, Jr., Rusla M. DuBreuil,
Shanker P. Reddy, Thomas P. Dooley

摘　要：本章介绍应用尼龙膜 DNA 微阵列结合放射性或非放射性标记杂交探针进行基因表达谱研究的方法。DermArray®尼龙膜 DNA 微阵列专门为皮肤病研究而研制，这种已申请专利保护的方法为这一 DNA 微阵列选择了约 4400 个序列已经验证、信息量丰富的人 cDNA 克隆。采用 DermArray®尼龙膜技术，在正常和病理状况下的皮肤细胞中及皮肤对皮肤病药物的反应中，发现了许多生物学标志物。比如，应用于研究氢醌处理的黑色素瘤细胞株 SKMel-28 的基因表达谱。本章还介绍应用 Pathway™软件进行生物信息学分析的方法。

关键词：生物标记；氢醌；黑色素细胞；色素沉着；杂交；DNA 微阵列；生物信息学

1　导言

IntegriDerm 公司（http：//www. integriderm. com）专门开发了可应用于皮肤病学研究领域的 DermArray®尼龙膜 DNA 微阵列。该产品包含大约 4400 个序列经过验证的人 cDNA 克隆（PCR 扩增产物）。这些 cDNA 采用 Cartesian 自动仪点样于 5 cm×7 cm 的尼龙膜上。这些基因采用一种筛选人类皮肤细胞差异表达基因的专利技术，从 26 000 个人 cDNA 克隆中选择出来。DermArray 膜包括皮肤病学者感兴趣的 383 个基因，每个基因点样三次，于是可以让研究人员评估一张或多张尼龙膜上杂交信号强度的统计学差异。使用一张膜时，需要在同一张膜上进行多个循环的探针剥脱/杂交；使用多张膜时，每张膜只与唯一探针杂交，多张膜可同时进行比较。

我们最近已报道应用 DermArray 技术结合新的似然比生物信息学算法，从体外培养的人黑色素细胞、角质形成细胞和成纤维细胞中鉴定生物标记[1]。我们鉴定出了 136 个基因在其中一种细胞中表达量显著高于另外两种细胞，称之为“正像生物标记”；22 个基因在其中一种细胞中的表达量明显低于另外两种细胞，称之为“反像生物标记”。我们从特定细胞类型鉴定出的基因中，有约 41%的生物标记在以往文献中曾经证实存在于该细胞类型或人类皮肤，因此支持了微阵列方法和分析的准确性。我们鉴定出了许多以往未被证实的与皮肤生物学相关的基因，包括 17 个正像生物标记（以未知功能的 EST 片段形式鉴定出来）和 22 个反像生物标记[1]。我们还应用 DermArray 技术分析了黑色素瘤、鳞状细胞癌及药物处理的皮肤来源细胞的基因表达谱（Dooley 和其同事的未发表结果）。图 38. 1 是一张典型的 DermArray 杂交实验结果。

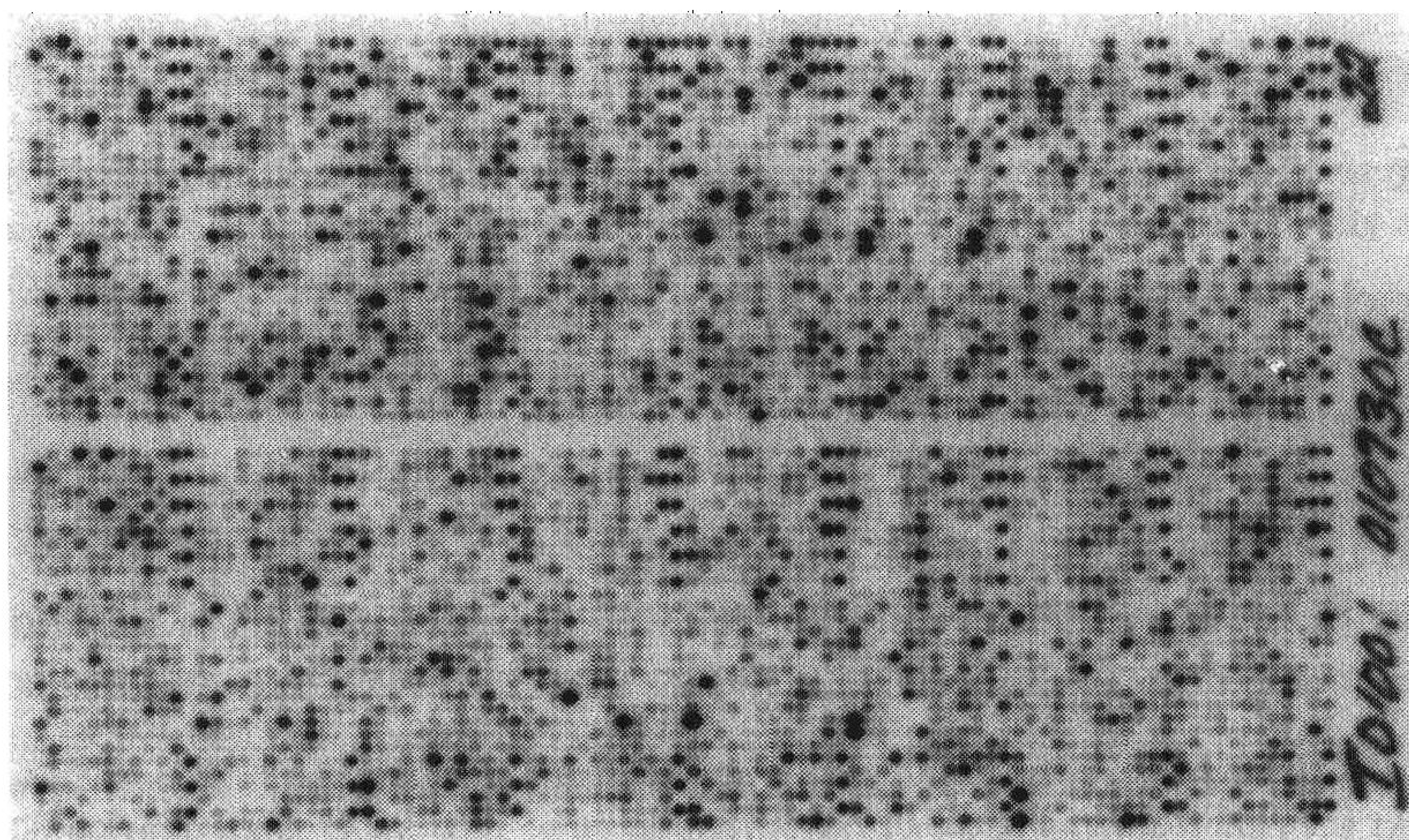


图 38.1 DermArray 微阵列杂交实验举例

在^{33}P-dCTP 存在下，逆转录酶把 3 μg 人总 RNA 转化为 cDNA，变性后加入装有 DermArray®微阵列膜的杂交滚动瓶中。在 42℃杂交 16 h。杂交膜按照本文描述的方法漂洗，然后于室温下暴露于磷光成像屏 16 h。所显示图像由 Packard Cyclone®磷光成像仪生成，以 TIFF 文件格式保存。

为了进行药理学和毒理学研究，我们还开发了 PharmArray® DNA 微阵列。这种微阵列便于研究者缩小研究基因或分子靶标的范畴，排除了吸收、分布、代谢、排泄（absorption，distribution，metabolism，excretion；ADME）代表性器官结肠、肾脏、肝脏中同时上调表达的基因（Dooley 和其同事的未发表结果）。PharmArray 包含从人 35 000个 cDNA 克隆中筛选出来的大约 4400 个人 cDNA 克隆，同时含有 384 个一式三份的、与药理学相关的单个基因。

我们在本章中提供为演示尼龙膜微阵列产品的使用方法和应用而设计的一系列实验方案，包含总 RNA 分离、放射性或非放射性探针的制备、DermArray 杂交、放射性自显影照片获得、数据提取和 Pathway™软件分析。

我们应用微阵列技术的一个特殊实例是研究氢醌对皮肤色素沉着的影响。色素沉着是一个复杂的多步骤过程，发生于黑色素细胞的黑色素小体内，由酶将酪氨酸转化为黑色素，然后黑色素小体转移到表皮的角质形成细胞内[2]。遗传或环境因素可以导致人体皮肤色素沉着的异常，包括色素沉着过度和色素沉着不足（如白癜风）。

有许多非处方的局部皮肤养护产品可以用于治疗色素沉着过度，即老年斑或黑斑。许多这类的药物含有氢醌（HQ）成分，其浓度为 1.5%～4%。尽管氢醌治疗色素沉着疾病在临床应用中是有效的，但它也对黑色素细胞具有很强的刺激性、诱变活性和细胞毒性[3,4]。通常认为，氢醌通过直接抑制酪氨酸酶（导致黑色素生成的生化途径中的一种关键酶）的活性而发挥作用。然而最近的证据提示氢醌可能对黑色素细胞有直接的细胞毒作用和（或）非酶性的化学漂白作用。不管类似氢醌的化合物的作用机制如何，现在有可能应用现代的后基因组研究工具如 DNA 微阵列技术[5~7]，测定局部皮肤色素减退剂影响体外培养细胞基因表达的全貌。

下面的实验方案说明了如何应用尼龙膜DNA微阵列方法（如DermArray®技术）检测氢醌对SKMel-28细胞基因表达的剂量-反应效应，意图将其作为应用微阵列技术解决复杂的生物学问题的一个特例。本实例中，分析了不同剂量氢醌作用下约4400个基因的表达谱，与非处理组培养细胞相比较，分为上调表达和下调表达两类。在氢醌处理的反应中，上调表达的基因（通常表达增高2.5倍或以上）称为“前哨生物标记”，而下调表达的基因称为“反前哨生物标记”。图38.2显示氢醌影响培养的人SKMel-28细胞基因表达的剂量-反应曲线。对前哨生物标记和反前哨生物标记的反应都予以了记录。

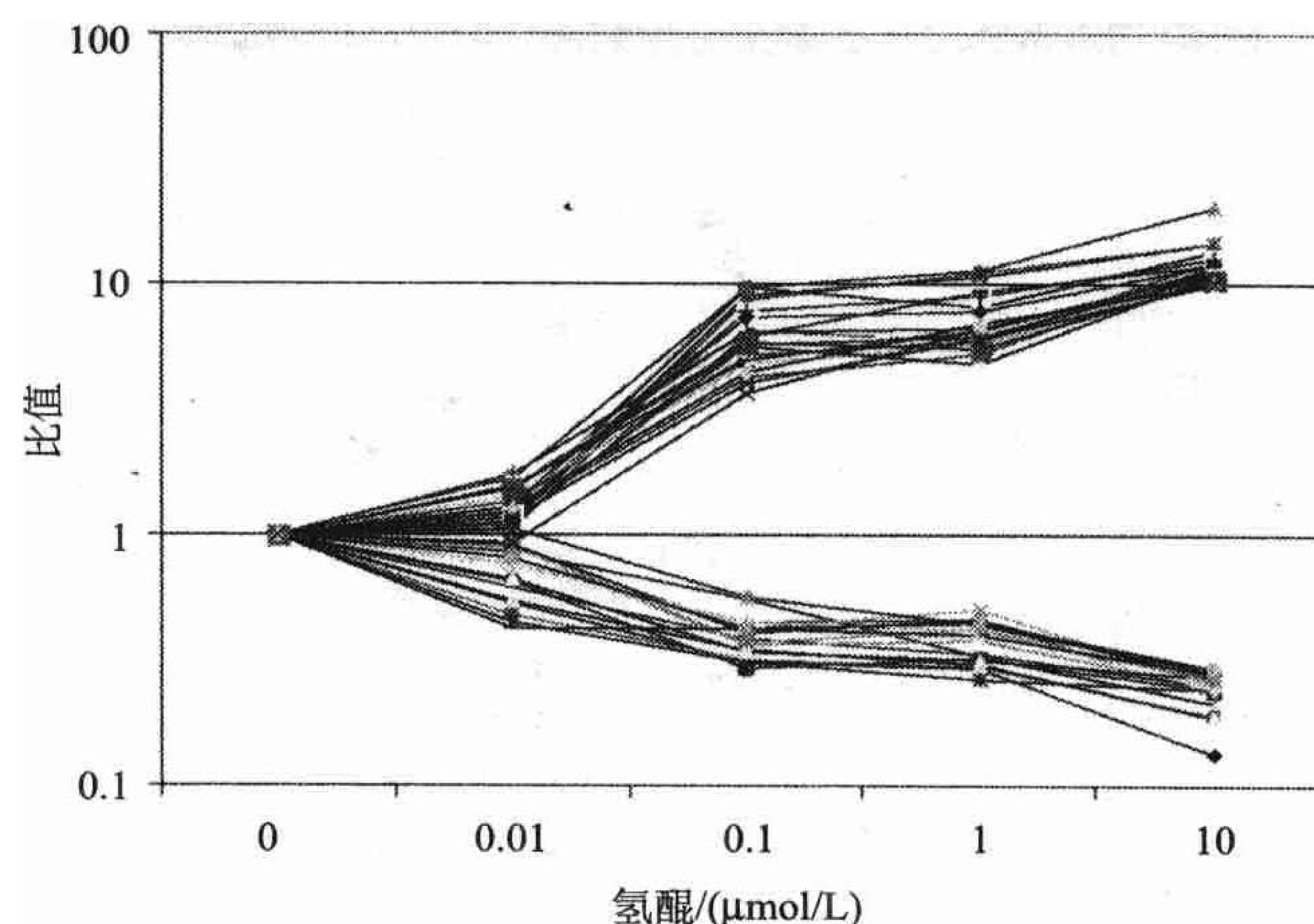


图38.2　氢醌影响培养的人SKMel-28细胞基因表达的剂量-反应曲线

图中显示与未处理对照组细胞比较，基因显著上调（前哨）或下调（反前哨）的单个基因的样本。

我们还介绍了两种非放射性标记和检测的方法，如地高辛-dUTP标记法，以及随后的化学发光检测和NBT/BCIP呈色法。在图38.3中，尼龙膜（类似于DermArray®）已用于非放射性标记和检测。

2　材料

2.1　样本处理

DermArray及PharmArray DNA微阵列实验涉及使用^{33}P标记的探针，因此需要掌握放射性材料的安全使用。应按国家和地方法规登记同位素的使用情况，使用放射性材料的相关实验应在隔离的实验区进行，并需监测同位素的泄漏。使用同位素的任何时候都应戴手套和穿实验室工作服。操作同位素的移液器应和其他实验的用品分别存放。

2.2　总RNA分离

RNeasy Midi试剂盒（Qiagen，Valencia，CA；cat. no. 75144）。

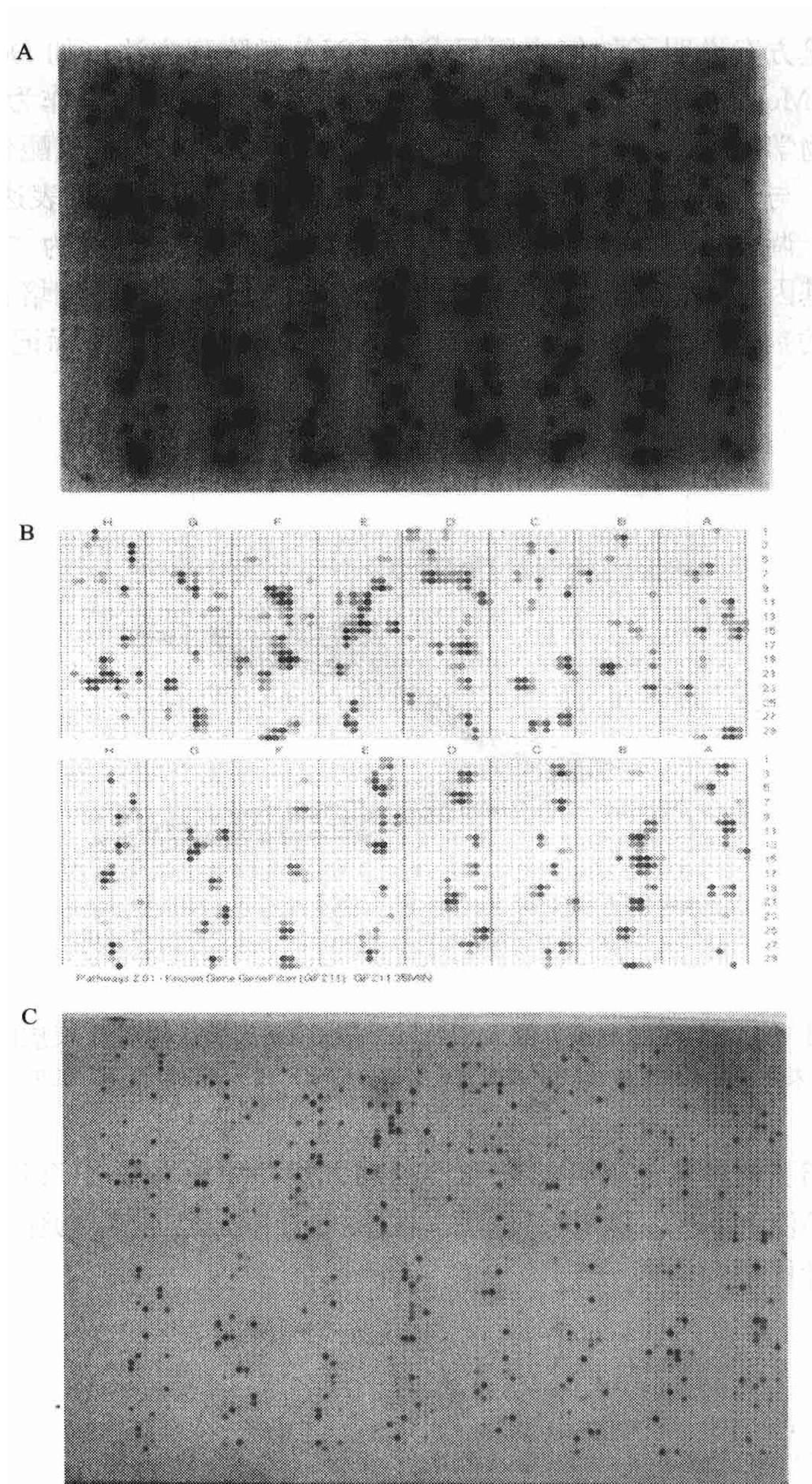


图 38.3　一例地高辛标记样本的尼龙膜（GF 211；Invitrogen）微阵列的基因表达谱

A. 应用 Lumi-Imagier™检测 CDP star 化学发光信号的一张过度曝光图像。B. 采用 Pathways 软件处理 A 图后生成的计算机合成图像。C. 尼龙膜用 NBT/BCIP 处理产生呈色反应，生成可以用 Pathways 软件分析的图像。

2.3　cDNA 探针制备（放射性标记）

（1）Superscript II 逆转录酶（Invitrogen，Carlsbad，CA；cat. no. 18064-014）。

（2）5×第一链缓冲液（Invitrogen；cat. no. 18064-014）。

(3) 0.1 mol/L 二硫苏糖醇 (Invitrogen; cat. no. 18064-014)。

(4) ^{33}P-dCTP (10 mCi/mL, Perkin/Elmer Life Sciences, Boston, MA; cat. no. NEG613H)。

(5) 无核酸酶的水 (Promega , Madison, WI; cat. no. P119C)。

(6) 20 mmol/L dNTP 混合液 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; cat. no. 27-2035-02): 以 100 mmol/L 的储备液和无核酸酶的水配制新鲜的 dATP、dGTP 及 dTTP, 均为 20 mmol/L 的混合液。

(7) Bio-Spin 6 色谱柱 (Bio-Rad, Hercules, CA; cat. no. 732-6002)。

2.4 cDNA 探针制备 (非放射性标记: 见 3.3)

(1) 1 mmol/L 地高辛-11-dUTP (Roche, Indianapolis, IN; cat. no. 1573152)。

(2) 无核酸酶水 (Promega, Madison, WI; cat. no. P119C)。

(3) 地高辛 DNA 标记和检测试剂盒 (Roche; cat. no. 1093657)。

(4) CDP-Star 底物系统 (Roche; cat. no. 2041677)。

(5) 硝基四唑氮蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐 (NBT/BCIP) (Roche; cat. no. 1681451)。

(6) 20 mmol/L dNTP 混合物 (含 dATP、dGTP 和 dCTP) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; cat. no. 27-2035-02)。

(7) 20 mmol/L dTTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; cat. no. 27-2035-02)。

(8) 葡聚糖凝胶 (Sephadex) G-50 离心柱 (Roche; cat. no. 1273973)。

(9) mRNA 捕获试剂盒 (Roche; cat. no. 1787896)。

2.5 微阵列杂交和漂洗

(1) MicroHyb 杂交溶液 (Invitrogen; cat. no. HYB250. GF)。

(2) 人 Cot-1 DNA (Invitrogen; cat. no. 15279-011)。

(3) 多聚腺苷酸 (Poly A) (Invitrogen; cat. no. POLYA. GF)。

(4) 寡聚脱氧胸腺嘧啶 (Olig dT) (Invitrogen; cat. no. POLYA. GF)。

(5) 20×标准枸橼酸盐 (SSC) 溶液 (Invitrogen; cat. no. 15557-044)。

(6) 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液 (Invitrogen; cat. no. 24730-020)。

(7) 5420 型杂交炉 (Hybridization Oven) (VWR Scientific; cat. no. 25000-000)。

(8) 35 mm ×150 mm 杂交滚动瓶 (VWR Scientific; cat. no. 16300-304)。

(9) Opti-Flour®液体闪烁仪 (Packard Bioscience; cat. no. 6013199)。

2.6 图像获取及微阵列数据分析

(1) Cyclone® 储存荧光系统 (Cyclone® storage phosphor system, Perkin/Elmer Life Sciences, Meriden, CT), 配备的 OptiQuant® 软件可用于放射性和非放射性标记的分析。

(2) Cyclone® 多功能储备磷光屏 (Cyclone® multipurpose storage phosphor screen, Perkin/Elmer Life Sciences; cat. no. 70014809902)。

(3) Lumi-Imagers®发光成像仪（Roche；cat. no. 2012847），另一种可以捕获化学发光探针图像的仪器（见 3.3）。

(4) Pathways™ 4 通用软件（Pathways™ 4-Universal Software，Invitrogen；cat. no. PW4. UC）。

3 方法

3.1 放射性探针标记及微阵列杂交

本节描述采用体外培养细胞（以 SKMel-28 细胞为例）的总 RNA 为模板制备放射性 cDNA 探针的方法，标记探针与 DermArray® DNA 微阵列尼龙膜杂交的步骤，杂交后的漂洗，漂洗后尼龙膜在储存磷光屏下的曝光，以及最好已曝光尼龙膜的图像捕获。

3.1.1 DermArray® DNA 微阵列尼龙膜的预杂交

如果初次应用 DermArray® 微阵列，将尼龙膜放在一个塑料盒内，倒入沸腾的 0.5%SDS 浸没它。在旋转振荡器上轻轻摇荡塑料盒 5 min，此步骤的目的是去除微阵列尼龙膜生产过程中携带在膜上的不良残质［见注意事项（1）］。

(1) 将 DermArray®滤膜放入 35 mm ×150 mm 杂交滚动瓶中，为避免 DNA 点样点接触玻璃，需使 DNA 点样的一面朝向瓶子内部［见注意事项（2）］。

(2) 瓶内加 5 ml MicroHyb 杂交液，旋紧瓶盖。用双手水平晃动杂交瓶，使滤膜贴附于玻璃瓶的内侧壁，且玻璃与滤膜之间没有气泡。

(3) 向滚动瓶内加入下列核酸试剂：5 μl Cot-1 DNA（总量 5 μg）［见注意事项（3）］和 5 μl 多聚腺苷酸（总量 5 μg）。

(4) 旋紧瓶盖，竖立瓶子并摇晃数次，使溶液充分混匀。将瓶子水平放置于已事先调至 42℃的杂交炉中，转动速度设定为最大速度的 1/3，预杂交至少持续 2 h。

3.1.2 总 RNA 的提取及放射性探针制备

可以应用商品化的 RNA 提取试剂盒从培养的细胞中提取总 RNA［见注意事项（4）］。例如，SKMel-28 细胞经 10 倍梯度稀释的氢醌（浓度范围 0.01～100 μmol/L）处理后，行 RNA 提取，未经氢醌处理的细胞 RNA 可以用做微阵列分析的对照。

(1) 在细胞培养容器中，加入 2 ml Qiagen 缓冲液 RLT（使用前，每 1 ml RLT 缓冲液加入 10 μl β-巯基乙醇）直接裂解培养细胞。摇荡容器，以确保细胞完全裂解。将 2 ml 已裂解细胞的溶液转移到 50 ml 灭菌的尖底离心管内。

(2) 裂解物中加入等体积的 70%乙醇，并颠倒混匀。

(3) 将样本，包括可能已形成的全部沉淀物，加于放置在 15 ml 离心管内的 RNeasy 小量过滤柱（Qiagen 试剂盒提供）内，轻轻盖紧，3000～5000 *g* 离心 5 min，弃去滤出液。

(4) RNeasy 过滤柱上加 4 ml Qiagen RW1 缓冲液，轻轻盖紧，3000～5000 *g* 离心 5 min，弃去滤出液。

(5) 向 RNeasy 过滤柱上加 2.5 ml Qiagen RPE 缓冲液。轻轻盖紧，3000～5000 *g*

离心 2 min 以洗涤过滤柱，弃去滤出液。

(6) 向 RNeasy 过滤柱上再加 2.5 ml Qiagen RPE 缓冲液。轻轻盖紧，3000～5000 g离心 5 min，空气中干燥 RNeasy 的硅胶膜。

(7) 为洗脱总 RNA，将 RNeasy 柱转移到一个新的 15 ml 收集管（Qiagen 试剂盒提供），用移液器将 250 μl 无 RNA 酶的水直接加在 RNeasy 硅胶膜的中央。轻轻盖紧管盖。静置 1 min，然后 3000～5000 g 离心 3 min。

(8) 用另外 250 μl 无 RNA 酶的水重复上述洗脱步骤。

(9) 合并两次 250 μl 洗脱液到一个灭菌的无 RNA 酶的微量离心管中。将 RNA 溶液做 1∶20 稀释，通过测定 260 nm 处的光密度值，以确定该样本总 RNA 的浓度。

(10) 用 SpeedVac 浓缩器对总 RNA 样本进行浓缩，直到 RNA 浓度到达 0.5～1 μg/μl。

(11) 在每个灭菌的无 RNA 酶的 1.5 ml 微量离心管中加入下列各种溶液：3 μg 总 RNA（在不超过 8 μl 的无核酸酶水中），x μl 无核酸酶的水补足总 RNA 的体积到 8 μl，2 μl oligo dT，盖紧离心管盖。

(12) 每管的总体积为 10 μl，置于 70℃ 10 min，迅速在冰上冷却 2 min，快速离心，收集每管管底的样本。

(13) 在每管中加入下列成分：6 μl 5×第一链缓冲液，1 μl 0.1 mol/L 二硫苏糖醇，1.5 μl 20 mmol/L dNTP 混合物，1.5 μl Superscript II 逆转录酶，10 μl ^{33}P-dCTP，每样本管的总体积为 30 μl。盖紧离心管，微量离心机快速离心，然后 37℃ 孵育 90 min。

(14) 每个样本用一个 Bio-Spin 6 纯化柱翻转以使纯化柱的凝胶基质在悬浮缓冲液中均一分布。

(15) 在灭菌 15 ml 离心管管底放置一个 2 ml 收集管（与 Bio-Spin 柱一起提供），将 Bio-Spin 色谱柱安装在 2 ml 收集管内，使柱的顶端与收集管相适应，重新旋紧 15 ml 离心管盖，室温下用水平离心机 1800 g 离心 5 min。

(16) 将 1.5 ml 无菌无核酸酶的微量离心管的顶部切掉，然后放入另外一个 15 ml 无菌离心管中。再将填充好的 Bio-Spin 柱放入上述离心管，使 Bio-Spin 柱的尖端与 1.5 ml 收集管相接触。

(17) 每个上述标记反应体系中加入 70 μl 无核酸酶的水，混匀，快速离心，转移所有反应体系内容物到填充好的 Bio-Spin 色谱柱的正中央，小心色谱柱不要和转移用的移液器吸头接触。

(18) 室温，1800 g 离心 5 min。将色谱柱从 15 ml 离心管中取出，放在放射性固体废物容器中。

(19) 将 15 ml 离心管底收集的已标记 cDNA 探针转移到另一无菌无核酸酶的微量离心管中。

(20) 每一标记的探针取 1 μl 加入到 3 ml 液闪混合液中，用液闪计数仪测定并记录结果［见注意事项（5）］。

(21) 将全部标记探针溶液转移到一个螺口盖的 2 ml 微量离心管中，旋紧管盖。将该管在沸水浴中放置 3 min 以变性探针，然后迅速在冰上冷却。快速离心盛有探针的离

心管，收集管底的探针溶液。

3.1.3 探针与 DermArray®微阵列的杂交

（1）停止杂交炉的转动，取出装有预杂交微阵列膜的滚动瓶，开启瓶盖。

（2）将滚动瓶直立，用 P-200 移液器小心地加入所有探针溶液到滚动瓶的杂交液中。切勿使探针溶液飞溅到滚动瓶侧面的微阵列膜上。重新旋紧瓶盖，仍保持滚动瓶处于垂直，逆时针方向摇晃滚动瓶以确保杂交液混匀。

（3）将滚动瓶重新放回杂交炉，维持温度于设定的 42℃，设定转动速度为最大速度的 1/3。

（4）转动杂交大约 10 min 后，暂停转动，取出滚动瓶，再次拧紧瓶盖［见注意事项（6）］。

（5）把滚动瓶重新放回杂交炉，42℃，继续以 1/3 的最大转速过夜。

3.1.4 微阵列膜的洗涤

（1）从杂交炉中取出滚动瓶，直立放置于支架上。小心拧开瓶盖，将杂交溶液倒入放射性废液回收罐。将杂交炉温度设为 50℃的洗涤温度。

（2）瓶内加入 30 ml 2×SSC 和 1%SDS 的溶液，旋紧瓶盖后，用手水平位滚动进行杂交滤膜的预清洗。拧开瓶盖，将预洗溶液倒入放射性废液回收罐。

（3）瓶内加入 30 ml 2×SSC 和 1%SDS 的溶液，重新放回杂交炉。设定到最大转速，50℃洗涤 20 min。

（4）从杂交炉中取出滚动瓶，将洗涤液小心倒入放射性废液回收罐。再次加入 30 ml 2×SSC 和 1% SDS 的洗涤溶液，50℃继续清洗 20 min。

（5）从杂交炉中取出滚动瓶，将第二次洗涤液倒入放射性废液回收罐。加入 30 ml 0.5×SSC 和 1% SDS 的洗涤溶液，50℃继续清洗杂交膜 20 min。

（6）从杂交炉中取出滚动瓶，将第三次洗涤液倒入放射性废液回收罐。

3.1.5 已杂交微阵列膜的曝光

（1）在清洗完成后，准备 8 in×10 in Whatman 3MM 滤纸，以蒸馏水浸湿后，放于另外一张稍大的 3MM 滤纸上。

（2）将微阵列膜 DNA 面朝上放在浸湿的 3MM 滤纸上，使微阵列膜有切口标记的角朝向右上方。

（3）把一张塑料膜覆盖在杂交膜上，用小滚筒推平塑料膜上的皱褶，用纸巾轻轻赶除塑料膜与微阵列膜之间的气泡。

（4）将包好的微阵列膜放入 8 in×10 in X 射线曝光盒中，关掉灯光，放上一张中等大小的多功能磷光成像屏（有磷光的一侧朝下面，面对杂交膜），使膜与磷光屏对齐（为了确保放射性自显影的图片在输入微阵列分析软件前不会扭曲变形）。

（5）放另外一张 8 in×10 in 成像屏（或者用 8 in×10 in 的卡纸板）于多功能成像屏上，压紧以使磷光屏与微阵列膜紧紧相贴。压上并锁紧 X 线曝光盒盖以避光。

（6）将微阵列膜在磷光成像屏上曝光 6 h 或过夜。曝光时间取决于探针的比放射

性活度。

3.1.6 已杂交微阵列膜上探针的洗脱［见注意事项（7）］

（1）微阵列膜在磷光屏下曝光后，将微阵列膜取出放在塑料托盘内，倒入沸腾的0.5%SDS溶液，使探针从滤膜上剥脱。

（2）室温摇荡托盘1 h。

3.1.7 用Cyclone®磷光成像仪获取图像

（1）杂交膜曝光完成后，在暗环境打开X线曝光盒，取出多功能磷光屏放于Packard Cyclone磷光成像仪的传送单元（屏的曝光侧朝外），小心地把多功能屏锁定在传送带的两端。将传送带放入Cyclone成像仓内，并确定仓盖已严密盖好以避免外部光线进入。

（2）点击OptiQuant™的应用按钮，并点击“仪器”，设置“记录装置分辨率”为600 dpi（每英寸点数）、“传送类型”为中等。

（3）按“开始”，Cyclone®成像仪将开始获取图像（对中等大小的多功能磷光屏，大约需要10 min）。

（4）图像获取完成后，放射性自显影图像将通过Opitquant软件显示在屏幕上。点击“转换”文件菜单，再点击“裁剪图像”，按住鼠标左键用裁剪工具箱选择裁剪范围，松开鼠标左键，按“是”裁剪出选择的范围。

（5）按“放大”按钮，将放大工具图标置于已裁剪的图像上，按鼠标左键以放大图像一倍。

（6）如必要，可以按“转换”文件菜单，再按“旋转图像”，选择90°或180°旋转，使微阵列的DermArray®编码可以显示在图像右侧垂直位置。

（7）点击“文件”菜单，再点击“另存为”并选计算机硬盘的合适目录来存储获得的图像。这些图像自动存储为TIFF文件格式。

3.2 采用Pathways™和Microsoft™的Excel表格程序分析微阵列

本节介绍应用Pathway™软件4.0版本进行微阵列数据文件的分析。Pathway™软件4.0版本是一个综合性软件工具，可以用来进行数据集的统计学分析，以多种方式显示微阵列数据，包括散点图和表格，通过用户自定义的条件对较大的数据集进行滤过分离得到较小的亚类。而且，该套软件包括多种聚类算法，可以拓展数据挖掘能力。这些规程涵盖原始微阵列TIFF图片输入Pathways的基本操作、数据分析，还包括使用Pathway软件的CSV格式转化为微软Excel表格，供进一步数据处理。

3.2.1 微阵列TIFF图像输入到Pathway软件

（1）双击桌面图标，启动Pathway 4.0软件。

（2）在Pathways快速启动对话框中，点击“输入新的微阵列图像”。

（3）在图像输入文件窗口中，点击“向上目录”图标，直到该目录中含有所需要的TIFF微阵列图像。

（4）在图像输入文件窗口，点击要输入到Pathways的TIFF文件。同样输入其他

需要输入的文件。

(5) 在选项中确认"TIFF 图像"为默认图像格式。用"基因过滤"选项确认微阵列种类——ID1001 (DermArray®的产品号) 或 ID1002 (PharmArray 的产品号)。样本类型选择"几何学"、"修剪图像"框进行校正。

(6) 当所有要输入的 TIFF 文件已添加到文件窗口之后，点击"OK"，开始输入。

(7) 向右移动对比度游标，以变暗或增强已显示的图像。

(8) 点击模板按键，然后点击图像上任意区域，拖拉后形成修建的矩形框。

(9) 移动修剪矩形图像框使右上角的红色方框靠近右上角的总基因组 DNA (tgDNA) 对照点 (DermArray®附带的文件中有一个微阵列图，该图显示了不同区域基因点样簇的组构、总基因组 DNA 和看家基因的位置等)，使右下角的红色方框靠近总基因组 DNA 对照点的右下角。

(10) 不选取调节整体框 (adjust global box)，确保选取使用放大框 (use magnifier box)。

(11) 按"向上"键，增加右上角总基因组 DNA 对照点的放大倍数；持续按住鼠标左键拖动图片，拖动红色方框直到它正好落在右上角总基因组 DNA 对照点的中央区域。在区域 1 中，余下的 7 个网格按照上述步骤重复操作。

(12) 在区域 2 中，网格 A 决定红色方框的位置，让红色方框移动到右下总基因组 DNA 对照点的中央。区域 2 中余下的 7 个网格按照上述步骤重复操作。

(13) 按"完成"结束文件的输入过程。

(14) 如需进行两个不同微阵列膜的 Pathways 比较，在 Pathways 快速启动对话框中点击"用强度比值和差异比较两个微阵列"的按钮。

(15) 在新项目框中，输入项目名称和研究者姓名，点击"下一步"。

(16) 在文库框中，点击代表对照微阵列膜的文件，点击"添加"，将文件加入到"第一阵列"中。

(17) 在文库框中，点击代表实验微阵列膜的文件，点击"添加"，将文件加入到"第二阵列"中。

(18) 点击"下一步"，选择"数据点标准化"，再点击"下一步"，然后点击"结束"。这些步骤就能完成微阵列的常规比较分析。

(19) 在屏幕右上角的"比较：成对微阵列 (通过地址)"窗口中，点击"X：log"和"Y：log"以便可以看到比较数据的对数曲线分布。

(20) 在"比较：成对微阵列 (通过地址)"窗口中，点击"报告"窗口。

(21) 在"数据"框的报告引导对话窗口中，选择以下对话框：克隆数目、强度 I、强度 II 和比率。在元数据框中，选择有 acc (登录号)、cDNA _ id 号、聚类 (cluster) _ id 及标题等对话框。

(22) 点击"保存"，以 CSV (coma separated file) 格式化数据的输出文件形式保存到合适的目录下。

3.2.2 将微阵列 CSV 文件转换为 Microsoft®Excel 文件

(1) 点击微软 Excel 程序图标。

（2）点击“文件”，再点击“打开”。选择包含 Pathways^{TM}输出的微阵列 CSV 文件的目录，在“文件类型”窗口中选择“所有文件类型”，然后在“打开”窗口中选择 CSV 文件。点击“打开”框就转换 CSV 文件为 Excel 文件。

（3）此后，数据可以按照标准 Excel 程序进行分类，可把所输入的数据文件存为 Excel 文件格式并供后续分析。

3.3 非放射性检测方法

本部分介绍用非放射性地高辛-dUTG（DIG-dUTP）标记 RNA 的方法，还讨论化学发光法和呈色沉淀法对 cDNA 产物的检测[8~10]。mRNA 或总 RNA 都可以用这种方法进行标记。在下述举例中，我们用 mRNA 作为起始材料，mRNA 可以用带有生物素标记的 oligo-dT 和链亲和素磁珠的 mRNA 提取试剂盒从人的细胞中提取。与上述放射性探针标记的方法大致相同，改动之处讨论如下。

3.3.1 DermArray®微阵列的预杂交

（1）在进行下面操作步骤前，剪掉微阵列膜上有书写墨迹的地方，因为墨水常常在检测过程中产生非特异性的信号。

（2）按照放射性标记的步骤，用 0.5%SDS 对每一微阵列膜进行预清洗。将膜放在 35 mm×150 mm 杂交滚动瓶中，DNA 一侧朝瓶内，以避免与玻璃接触。

（3）杂交滚动瓶中加入下列成分：5 ml DIG Easy Hyb 杂交溶液（Roche）；5 μl 变性的 Cot-1 DNA（1 μg/μl）；5 μl 多聚腺苷酸 A（1 μg/μl）。

（4）42℃预杂交 2 h。

3.3.2 DIG-dUTP 标记 mRNA

（1）在 200 ng mRNA 中，加入 2 μl Oligo dT 以引导逆转录孵育，总体积 8 μl。混匀，快速离心，混合物于 90℃变性 10 min，然后冰上迅速冷却。

（2）加入下列试剂（Superscript II 试剂盒；Invitrogen）：6 μl 5×第一链缓冲液；1 μl 0.1 mol/L DTT；1 μl dNTP 混合物（含 dATP、dGTP、dCTP 各 20 mmol/L）；0.25 μl dTTP 20 mmol/L；6 μl DIG-11-dUTP（1 mmol/L）；300 U Superscript 逆转录酶 II；总反应体积用无核酸酶的水调整到 30 μl。

（3）充分混匀，快速离心，37℃孵育 90 min，随后 70℃孵育以停止反应。

（4）用葡聚糖凝胶 G-50 柱过滤，从标记反应中去除未掺入的核苷酸。

（5）取 1 μl 纯化的探针，点样到尼龙膜上，用已结合碱性磷酸酶的抗 DIG 抗体孵育，然后按生产厂商的说明书（Roche），用 NBT/BCIP 进行检测，以确认标记物成功掺入。

3.3.3 DermArray®尼龙膜与非放射性探针杂交

（1）DIG-dUTP 探针在煮沸浴中放置 3 min 以变性，迅速在冰上冷却。

（2）将全部探针加入含有 DermArray®膜和预杂交液的滚动瓶中，小心不要使探针溶液直接沾湿滚动瓶侧面的微阵列薄膜。重新旋紧瓶盖，用手转动瓶子以使杂交液混匀。

（3）滚动瓶放入 VWR 杂交炉中，以最大转速的 1/3，42℃旋转过夜。

3.3.4 微阵列膜的清洗

(1) 膜与 DIG-dUTP 探针过夜孵育后，每次用 30 ml 2×SSC 和 1% SDS 的溶液，50°C 洗膜 20 min，共两次。

(2) 在塑料容器中，用 100 ml 0.5×SSC 和 1% SDS 的溶液做最后清洗，室温洗膜 15 min。

(3) 洗涤后，将膜放在已湿润的 Whatman 3MM 滤纸上，用塑料薄膜包裹。消除会干扰成像过程的气泡和皱褶。

3.3.5 化学发光检测

(1) 化学发光检测采用 Roche 公司的 CDP-Star 底物系统。该系统能产生可被 X 射线片、磷光成像仪或专用的化学发光检测设备识别的光学信号。杂交完成后，按照 3.3.4 中所述的方法进行严格的洗涤，然后尼龙膜用偶联碱性磷酸酶的抗 DIG 抗体 (Roche) 孵育，然后用 CDP-Star 系统检测。漂洗膜后，加入 20 ml 稀释的偶联碱性磷酸酶的抗 DIG 抗体 (37.5 mU/ml，1∶10 000)，孵育 30 min。

(2) 洗膜，在密封的杂交袋中用 1～2 ml CDP-Star 溶液 (25 mmol/L，1∶200) 孵育 5 min。

(3) 去掉多余的液体，将膜 (DNA 一侧朝上) 放置在 Whatman 3MM 滤纸。不要让滤膜完全干燥。将湿润的膜重新放入一个新的杂交袋，在 X 射线片上曝光 15 s～15 min，或者将膜放在 Lumi-Imager 仪器 (Roche) 中 15～35 min 以成像。

(4) 化学发光可持续数小时，允许对膜进行多次曝光以获得满意的图片。如果用 Cyclone 磷光成像系统或 Roche 的 Lumi-Imager 系统检测化学发光，所获得的图片可以不经转换直接存储为 16 位的 TIFF 文件格式。从化学发光获得的图像同从放射性同位素 ^{33}P 法获得的图像一样，可以用 Pathway 软件进行分析。

3.3.6 呈色沉淀的检测

另外一种显示微阵列膜上杂交点的方法是用 NBT/BCIP 溶液 (Roche) 处理膜，生成带颜色的沉淀，不需要化学发光法检测的进一步处理膜的步骤。呈色法检测不如化学发光法敏感，但是允许对已杂交微阵列点的大体观察，也确认了化学发光法检测的结果。此外，NBT/BCIP 处理的膜可以用传统的廉价的扫描仪以 800 dpi 扫描，生成的 8 位灰阶图像也可以用于 Pathway 软件分析。

3.3.7 地高辛-dUTP 标记探针杂交膜的剥脱

(1) 如碱性的不稳定的 DIG-dUTP 用于标记 cDNA 探针，那么从膜上剥离探针可以用灭菌去离子水短暂洗涤微阵列膜，再用 0.2 mol/L NaOH，0.1% SDS 37℃洗涤 15 min，共两次。最后用 2×SSC，37℃洗涤 5 min。用此法剥脱的膜可以重新用来再标记，但要注意，在所有操作步骤中不允许这些膜完全干燥。

(2) 对于呈色沉淀法显示图像的膜，可以先将膜放于二甲基甲酰胺中摇荡，然后用沸腾的 0.5% SDS 持续 1 h 就可以剥脱探针。

4 注意事项

（1）DermArray 或 PharmArray DNA 微阵列膜用沸腾的 0.5% SDS 处理只是在初次应用该膜时是必需的。

（2）微阵列膜的 DNA 点样面是标记了目录号和批号的一面。

（3）Cot-1 DNA 应于 100℃煮沸 3 min，迅速放于冰上冷却 2 min，然后加样于滚动瓶。

（4）我们推荐每个探针的标记反应使用 3 μg 总 RNA，但 1～10 μg 的总 RNA 都是可以成功标记的，或者用 100 ng～1 μg 纯化的 mRNA 来进行探针标记。

（5）通常每个标记探针要有不少于 10^7 cpm/μl 的掺入率才能获得满意的图像，以进行后续的 Pathway 软件分析。

（6）摇荡 10 min 后重新拧紧瓶盖是必要的，因为聚四氟乙烯瓶盖在 42℃会膨胀，重新拧紧瓶盖，减少过夜孵育过程中探针从杂交瓶漏入杂交炉的机会。

（7）DermArray 和 PharmArray 微阵列膜可以进行剥脱和再检测达 5 次以上，依然能够获得漂亮的结果。

（苏踊跃 译　罗向东 校）

参考文献

[1] Curto，E. V.，Lambert，G. W.，Davis，R. L.，Wilborn，T. W.，and Dooley，T. P.（2002）Biomarkers of human skin cells identified using DermArray® DNA arrays and new bioin-formatics methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**，1052－1064.

[2] Dooley，T. P.（1997）Topical skin depigmentation agents：current products and discovery of novel inhibitors of melanogenesis. *J. Dermatol. Treat.* **8**，275－279.

[3] Dooley，T. P.，Gadwood，R. C.，Kilgore，K.，and Thomasco，L. M.（1994）Development of an in vitro primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents. *Skin Pharmacol.* **7**，188－200.

[4] Smith，C. J.，O'Hare，K. B.，and Allen，J. C.（1988）Selective cytotoxicity of hydroquinone for melanocyte-derived cells is mediated by tyrosinase activity but independent of melanin content. *Pigment Cell Res.* **1**，386－389.

[5] Zhao，N.，Hashida，H.，Takahashi，N.，Misumi，Y.，and Sakaki，Y.（1995）High-density cDNA filter analysis：a novel approach for large-scale，quantitative analysis of gene expression. *Gene* **156**，207－213.

[6] Schena，M.，Shalon，D.，Davis，R. W.，and Brown，P. O.（1995）Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**，467－470.

[7] Cole，J.，Tsou，R.，Wallace，K.，Gibran，N.，and Isik，F.（2001）Comparison of normal human skin gene expression using cDNA microarrays. *Wound Repair Regen.* **9**，77－85.

[8] Ross，R.，Ross，X. L.，Rueger，B.，Laengin，T.，and Reske-Kunz，A. B.（1999）Nonradioactive detection of differentially expressed genes using complex RNA or DNA hybridization probes. *Biotechniques* **26**，150－155.

[9] Adryan，B.，Carlguth，V.，and Decker，H. J.（1999）Digital image processing for rapid analy sis of differentially expressed transcripts on high-density cDNA arrays. *Biotechniques* **26**，1174－1179.

[10] Engler-Blum，G.，Meier，M.，Frank，J.，and Muller，G. A.（1993）Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sen-sitivity than ^{32}P-based hybridizations. *Anal. Biochem.* **210**，235－244.

第 39 章　表皮内双光子荧光成像及活性氧检测

Kerry M. Hanson，Robert M. Clegg

摘　要：双光子荧光显微镜检查法常用于检测紫外线诱导离体人皮肤和皮肤替代物的表皮及真皮所产生的活性氧。用非荧光活性氧探针二氢罗丹明孵育皮肤，二氢罗丹明能与活性氧（如单线态氧及过氧化氢）反应生成荧光罗丹明-123。与激光共聚焦显微法不同，双光子激发可深度穿透表皮和真皮，而对检测样品仅有很少的光损害。这种方法也为我们检测产生活性氧的亚细胞结构提供亚微米的精细空间分辨率。另外，设立对照试验可以在任何层次或细胞区域检验施加因素（如药物、治疗方法）对皮肤内产生活性氧水平的影响。

关键词：活性氧；双光子；荧光；显微镜；抗氧化剂

1　导言

活性氧（ROS）是具有高反应性、短寿命的分子氧衍生物。超氧阴离子（$O_2^{\cdot-}$）、过氧化氢（H_2O_2）及自由基样的单线态氧（$^1O_2$）和羟基自由基（$\cdot OH$）是常见的活性氧，在细胞水平具有重要的生物学意义。活性氧在正常细胞的活动中起着关键的作用，例如，$O_2^{\cdot-}$ 与 H_2O_2 是正常线粒体需氧呼吸的一部分。在代谢过程中细胞内产生的活性氧是降低细胞增殖和引起损伤的内在机制。而引起极大关注的是过量产生的活性氧攻击天然防御机制，造成细胞损伤，例如，紫外线辐照后皮肤内产生过量活性氧所造成的损伤。溶液状态和细胞培养的研究显示，紫外辐照后表皮的发色基团（核黄素、还原型辅酶 I/还原型辅酶 II、色氨酸、咪唑丙烯酸[1~6]，以及细胞组件线粒体[7]和黑色素[7,8]）产生活性氧，包括单线态氧、过氧化氢、超氧阴离子及羟基自由基。这些活性氧可能与细胞类脂膜和蛋白质发生反应[9]，改变免疫应答[10]，导致 DNA 损伤[11]与细胞凋亡[12]。这些结果促使研究人员讨论紫外诱导皮肤产生的活性氧对皮肤光老化[13]、光化性角化病[14]和皮肤肿瘤发生[15]的影响。

随着激光技术及荧光显微方法的发展，我们现在已经拥有研究皮肤内活性氧及其后续的活性氧介导通路的技术手段。本章详细地介绍双光子荧光显微法，其实验方案可用于检测表皮及真皮所有层次内的活性氧水平。双光子荧光显微法是一种检测皮肤活性氧的理想方法，因为它能提供亚微米级的空间分辨率及亚毫米级的深度穿透，而且光损害可忽视不计。双光子荧光显微法的部件（激光源、光学器件及显微镜）均可从市场上购买。这种方法可以很容易地对离体皮肤样品、皮肤替代物或整体动物进行研究。通过配备的内窥镜附件，该方法也能应用于人体。

因为活性氧具有寿命短且无荧光的特性，所以采用活性氧荧光探针二氢罗丹明

(DHR) 间接检测活性氧。无荧光的 DHR 与活性氧（包括 H_2O_2、$^1O_2$、$ONOO^-$）反应生成有荧光的罗丹明-123（R123）。R123 显示出易于检测的强荧光，吸收峰值在 525 nm。也可以使用具有特异性细胞靶点的其他活性氧探针[16]。鉴于此，我们示范如何用双光子荧光显微法通过 R123 荧光检测亚细胞水平的活性氧。我们也探讨怎样用这种方法检测在特定皮肤深度所产生的活性氧水平，这可以用于评估外用药影响皮肤内活性氧产生的检测。

随着目前探针技术的发展，双光子荧光成像技术可用来检测细胞组件（线粒体、细胞核、类脂膜）内特殊位置的活性氧及随后的活性氧所介导的通路。

2 材料

2.1 组织样品与准备

2.1.1 离体组织 [见注意事项 (1)]

(1) 人胸部、腹部或面部皮肤。

(2) 未包被塑料平皿 (35 mm×10 mm)(BD Falcon plastic dishes, Fisher Scientific; cat. no. 08757100a)。

(3) 4℃冷藏柜。

(4) 无指示剂的 RPMI-1640 (Invitrogen; cat. no. 11835030)。

(5) L-谷氨酰胺 (Sigma Aldrich; cat. no. G7513)。

(6) 庆大霉素 (Sigma Aldrich; cat. no. G1397)。

(7) 准备储存培养基：①500 ml 无指示剂 RPMI-1640；②2 mmol/L L-谷氨酰胺 (终浓度)；③10 μg /ml 庆大霉素 (5 mg/500 ml)。

(8) 制备离体组织样本：①用手术刀去除皮肤多余的皮下脂肪；②用手术刀将皮肤分成为 0.5 cm×0.5 cm 大小的样品；③将样品放入干净的未包被塑料平皿中；④加入足够的储存培养基，使每个样品均被培养基包绕，仅角质层露出液面；⑤样品在盛有培养基的平皿中 4℃保存不超过 5 d；⑥每 24 h 更换培养基。

2.1.2 皮肤替代物 [见注意事项 (2)]

(1) EpiDerm™ 200 或 Epiderm-FT™ 200 组织和生长培养基 (MatTek Corp., Ashland, MA)。

(2) 镊子。

(3) 37℃，5%CO_2 孵箱。

(4) 按照制造商的说明书制作和储存皮肤替代物 [见注意事项 (2)]。

2.2 荧光基团

(1) 活性氧探针：二氢罗丹明-123 (Molecular Probes, Eugene, OR; cat. no. D632)。

(2) 活力探针：线粒体绿色荧光探针专用包装 (Mitotracker Green FM * special packaging *, Molecular Probes, Eugene, OR; cat. no. M7514)。

2.3 双光子荧光成像显微镜（图 39.1）

钛：蓝宝石激光器（Tsunami，Spectra-Physics）[17]是双光子的激发光源。激光的 785 nm 输出（在扫描镜前所测量的功率为 3 mW）通过 Zeiss Axiovert 显微镜的表荧光通道连接在一起。分色滤光镜（Q560LP，Chroma Technologies）将激发光束转向至样品，经 Hamamatsu（R3996）光电倍增管检测样本的荧光。在荧光发射通路上放置两个 BG39 滤光片（每个厚 0.5 cm）以阻断散射的红外光（IR）继而让 R123 荧光通过。目镜中也放置有一个 BG39 滤光片（厚 0.5 cm）以阻断有害的激光到达眼睛。扫描镜通过无限校正（infinity-corrected）的 40 倍油镜（Zeiss F Fluar，1.3N.A.）设置激发光束的位置。SimFCS（Enrico Gratton，Laboratory for Fluorescence Dynamics，University of Illinois）程序软件通过一个三轴插件用卡（ISS，Urbana-Champaign）控制扫描仪。成像面积可达 4000 μm^2。使用机动化的驱动器（ASI Multi-Scan 4）来调节物镜的焦距以获得深度 z 的薄层断面。采用 12 位即插即用型模拟-数字转换器（ISS，Champaign，IL）将来自光电倍增管的光电流输出转换为数字信号。使用 SimFCS 软件的数据采集部分获取数据。

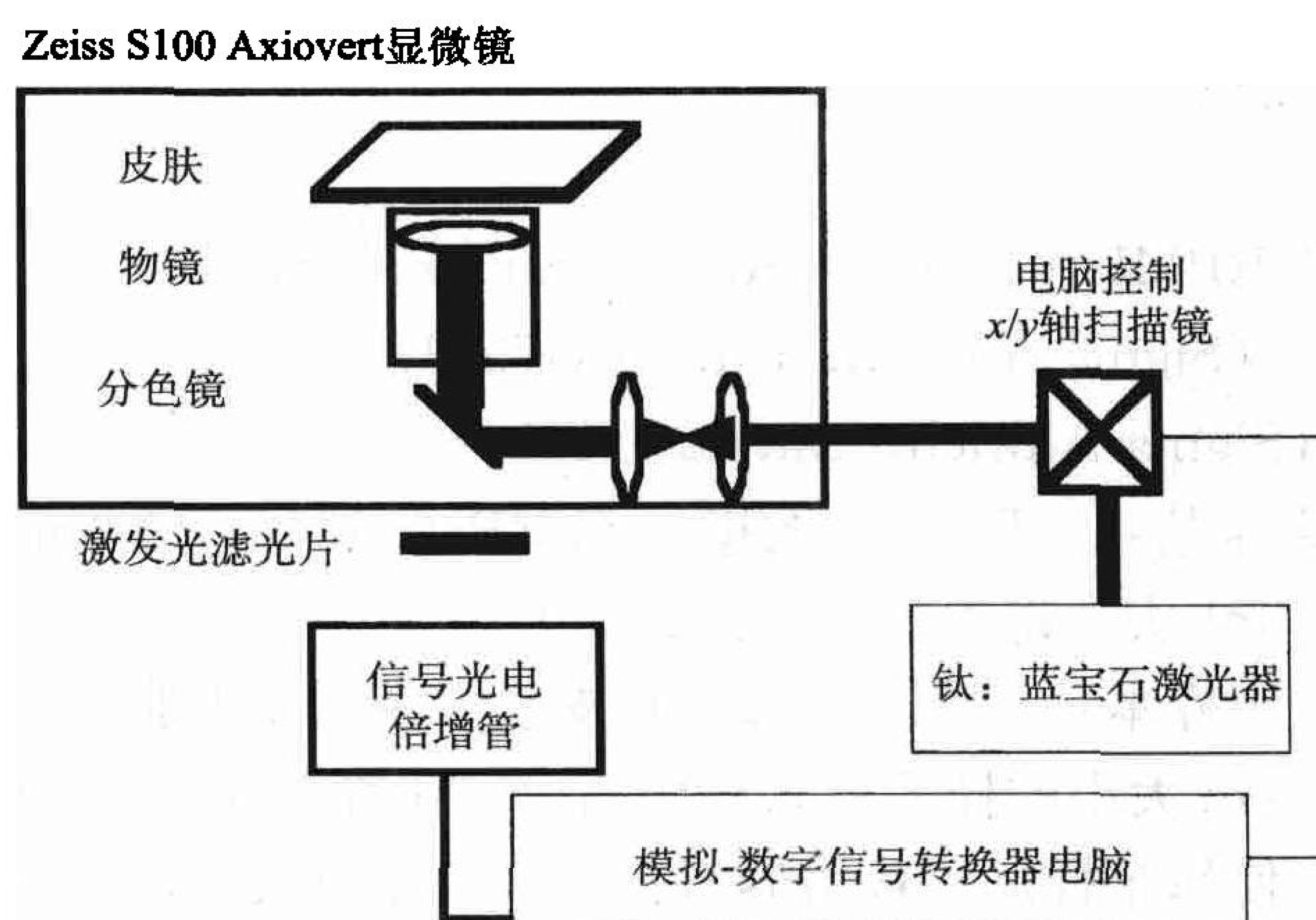


图 39.1　双光子荧光显微镜结构示意图

2.4 辐照装置

(1) UVA-UVB (280～450 nm) 日光模拟装置 (PMA2100；Solar Light Co.)。

(2) UVA-UVB 辐照检测器 (PMA2105 DCS Detector；Solar Light Co.)。

(3) 灯供电设备 (XPS200 Xe lamp power supply；Solar Light Co.)。

2.5 样品室

(1) 带凹面的悬滴载玻片 (76 mm×26 mm，0.5 mm concave well，18 mm diameter，Fisher Scientific；cat. no. 12-560A)。

(2) 盖玻片 (No. 1.5，40 mm×24 mm，Fisher Scientific；cat. no. 12-518-105E)。

3 方法

3.1 皮肤的荧光基团标记

3.1.1 用活性氧荧光探针（二氢罗丹明）标记皮肤

根据样品的来源（离体皮肤组织或有活性的皮肤替代物）选用不同的实验方案［见注意事项（4)］。

3.1.1.1 *离体皮肤*

（1）利用DHR在280 nm处光吸收与比尔定律，将DHR溶解于磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）与乙醇体积比为6∶1的混合液中配制浓度小于200 μmol/L的DHR溶液。含乙醇的PBS溶液既不会抑制线粒体的呼吸，也不会抑制酯酶或磷酸酶的活性[18]［见注意事项（5)］。

（2）转移200 μl DHR溶液至1 ml的EP管中。

（3）将0.5 cm×0.5 cm大小的离体皮肤样本放入EP管。

（4）DHR完全浸没皮肤样品。

（5）4℃孵育10 min。

（6）取出皮肤样品。

（7）用pH7.2的PBS冲洗。

（8）以实验室用薄纸巾（KimWipes）去除皮肤上多余的溶液。

（9）将皮肤样本转移至悬滴载玻片，且角质层一面朝上。

（10）盖玻片覆盖皮肤样本。

（11）用4个小固定夹固定盖玻片。

3.1.1.2 *皮肤替代物*

（1）利用DHR在280 nm处的光吸收与比尔定律，将DHR溶解于PBS与乙醇体积比为6∶1的混合液中配制浓度小于200 μmol/L的DHR溶液［见注意事项（5)］。

（2）用PBS将200 μmol/L的DHR储存液配制为10 μmol/L的DHR溶液。

（3）按照制造商的说明书使样品均衡后，以无菌技术［见注意事项（4)］将100 μl DHR溶液加至样品表面。

（4）37℃，5%CO_2孵育少于1 h。

（5）无菌条件下用镊子将EpiDerm™从其包装中取出，用pH7.2的PBS冲洗，然后将真皮面向下放置于悬滴载玻片上。

（6）盖上盖玻片，并用小固定夹固定。

3.1.2 标记皮肤以测其活力（线粒体呼吸）

这部分描述采用荧光探针Mitotracker Green FM标记皮肤的实验方案，该探针可以检测线粒体是否具有呼吸功能活性。这种检测为所用组织样品的活力情况提供重要的数据，研究者可据此判断组织样品的代谢活性。正在呼吸的线粒体具有完整的膜结构，有利于Mitotracker Green FM染色；无活性的线粒体不能保留Mitotracker Green FM

及其与呼吸功能相对应的组分。也可以利用其他的线粒体特异性荧光基团[16]。此外，还可用钙黄绿素-乙酰羟甲基酯（calcein-AM，Molecular Probes，Eugene，OR）或荧光素二磷酸（Molecular Probes，Eugene，OR）等荧光探针检测酯酶或磷酸酶的酶活性[16]，这些探针也可用下述实验方案标记皮肤。

（1）去除离体样品的角质层［见注意事项（6）］。①在一定位置固定皮肤样品（活体样品或 EpiDerm™），用透明胶带的黏性面贴住角质层揭下；②反复使用胶带直至去除角质层，此时肉眼见皮肤似乎有光泽。显微镜下检查样本以确认已去除角质层；③将组织样品转到一干净的平皿中，真皮面向下。

（2）准备 Mitotracker 孵育液。①由 Molecular Probes 公司提供以下产品信息。将一小试管试剂（50 μg）溶于无水二甲基亚砜中配制成终浓度为 1 mmol/L 的储存液；②用 pH 7.2 的 PBS 将储存液稀释配制成 500 nmol/L 的孵育液；③将条带状的离体皮肤样品放入含 200 μl 500 nmol/L Mitotracker 溶液的 EP 管中，4℃孵育 10 min；④皮肤替代物样品则用 100 μl 500 nmol/L Mitotracker 溶液，37℃孵育 1 h；⑤取出组织，用 pH7.2 PBS 冲洗，然后用 KimWipe 薄纸巾轻轻拍干组织；⑥将样品的真皮面向下放在载玻片的凹面上，盖玻片覆盖，并用小固定夹固定。样品成像将在 3.2 的步骤（1）～（12）中描述。

3.2 紫外辐照前的双光子荧光成像

这部分将讨论紫外线 A 光谱（UVA）和（或）紫外线 B 光谱（UVB）辐照前皮肤样品在 Zeiss Axiovert S100 显微镜下成像的实验方法。在辐照前收集样品的成像对于判断来自于自身荧光和荧光基团探针的本底荧光水平非常重要。

（1）用光束隔板阻断激光光束使之不能进入显微镜的表荧光通道。

（2）在显微镜台上放置样品载玻片使其盖玻片面朝向物镜。

（3）将样品载玻片固定于载物台上。

（4）滴一滴 Zeiss 显微镜油至 40 倍油镜孔中。

（5）使用粗调旋钮调节物镜至油液刚好接触至盖玻片。

（6）通过目镜观察，使用微调旋钮将皮肤表面调至焦距的位置。

（7）固定机动化的 z-载物台，使皮肤表面处的 $z=0$。

（8）用黑布罩住盒子，从而使物镜避开室内的光线。

（9）关掉房间内的灯。

（10）通过 SimFCS 软件收集数据，建立以下分析参数：①Z 增量（$>1\ \mu m$ 增量挡）；②X-Y 影像区域（$\leqslant 200\ \mu m \times 200\ \mu m$）；③取样时间（每个像素 50 μs）；④每个像素收集的点数[1]。

（11）开启激光束，在每一想要的深度 z 上采集影像。

（12）取下黑布和暗盒。

（13）从显微镜载物台上取下样本载玻片。

（14）从样本载玻片上取下盖玻片。

3.3 辐照样品

这部分我们将讨论在得到不同深度 z 的本底荧光水平后，用日光模拟器（Solar

Light Co.）辐照皮肤样品的实验方法［见 3.3 中的（1）～(7)］。

（1）打开日光模拟器。

（2）根据产品说明书，建立辐照剂量（100 J/m² = 1 标准红斑辐照剂量[19]）和辐照光谱［UVB 和 UVA（280～450 nm），或 UVA（320～450 nm)］。

（3）辐照前确保已将盖玻片从皮肤样品的载玻片上取下（因为玻璃能减弱 UV 光线）。

（4）将样品载玻片放置于光路中，使皮肤的角质层朝向光线。确保整个样品区域完全暴露于辐照光源下。

（5）按照产品说明书，以所需要的 UV 剂量与时间对皮肤样品进行照射。

（6）从日光模拟器上取下样品。

（7）用 4 个小固定夹将盖玻片固定于样本上。

3.4 UV 辐照后的双光子荧光成像（图 39.2 和图 39.3）

（1）按照 3.2 中的步骤（1)～(12）对样品进行再成像。

（2）使用 UV 辐照前获取图像数据类似的深度 z 获取图像数据［见注意事项（7)］。

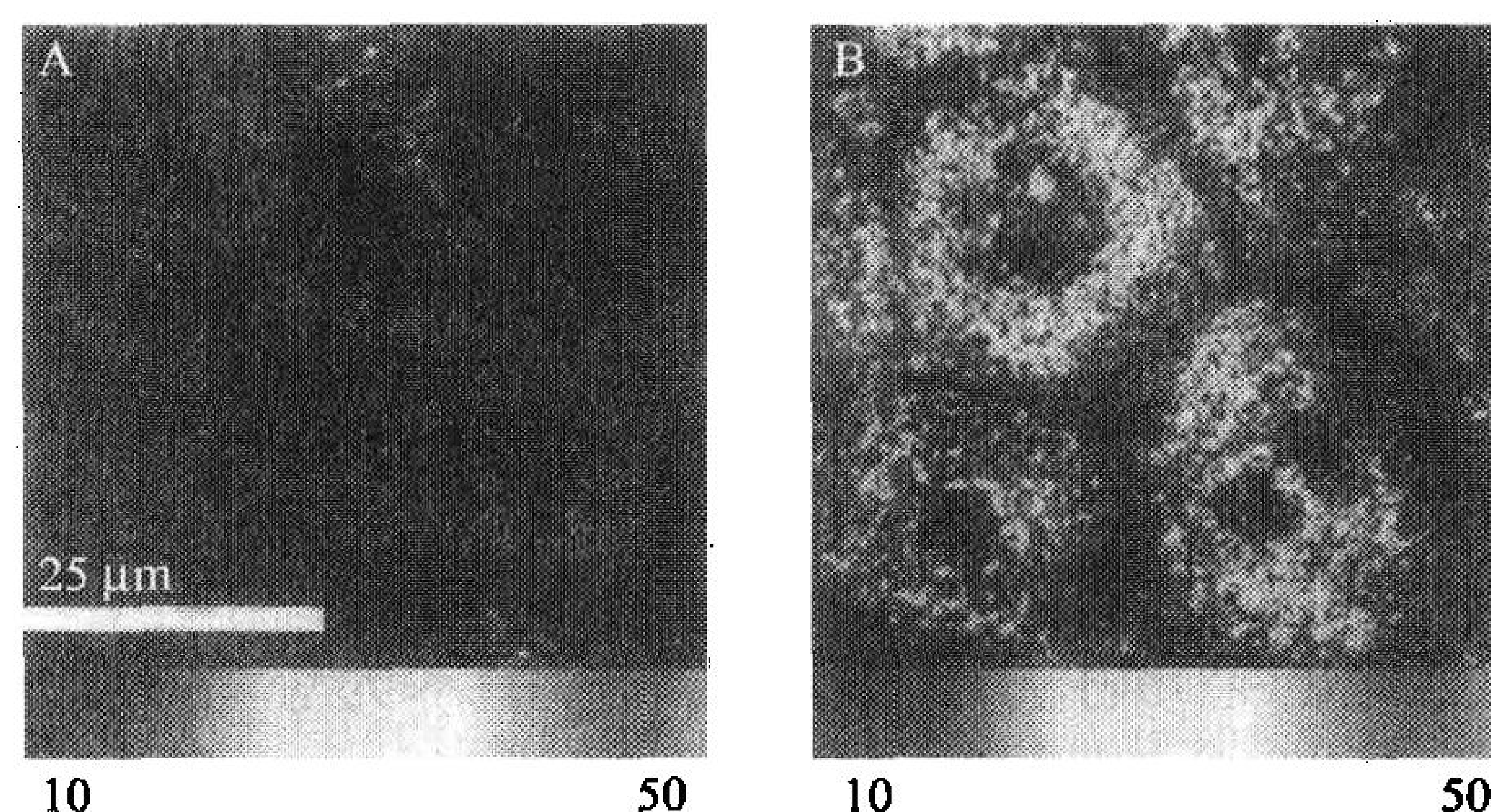


图 39.2　与 DHR 孵育的人胸部离体皮肤在 UV 辐照（600 J/m²）前（A)、后（B）的双光子荧光强度成像

成像距皮肤表面的深度为 15 μm，细胞为颗粒层的角质形成细胞。位于每一影像下的荧光强度标尺与光电倍增管读取的电压值相对应。图像 A 的色彩由黑色至蓝色，提示只有很少量的自发荧光。UV 辐照后，细胞质内的 R123 荧光显著增强，提示活性氧产生增加。图中可见线粒体、脂质颗粒及黑色素均是活性氧的来源[18]。（见文后彩图）

3.5 测定活性氧的水平

之所以对生成的活性氧浓度进行测定变得十分复杂，是因为我们对二氢罗丹明（或其他的活性氧荧光基团）与 UV 诱导的活性氧之间的反应动力学知之甚少。UV 辐照皮肤后产生数种活性氧，许多但不是所有的活性氧都能与二氢罗丹明反应[18]。因此，我们已建立的简化动力学模型可以用来计算特定 UV 剂量辐照后所产生的活性氧浓度。读者可查阅参考文献［18］中的详细描述。在本实验中，我们着重为那些研究化合物在皮肤特定深度的活性氧水平发挥效应的感兴趣者介绍一种简便的方法。

特别有趣的是，一些化合物如抗氧化剂，能减少所产生的损害性活性氧的数量。为了检测在深度 z 的 UV 诱导活性氧的降低，可以应用下列的式（1）进行计算。

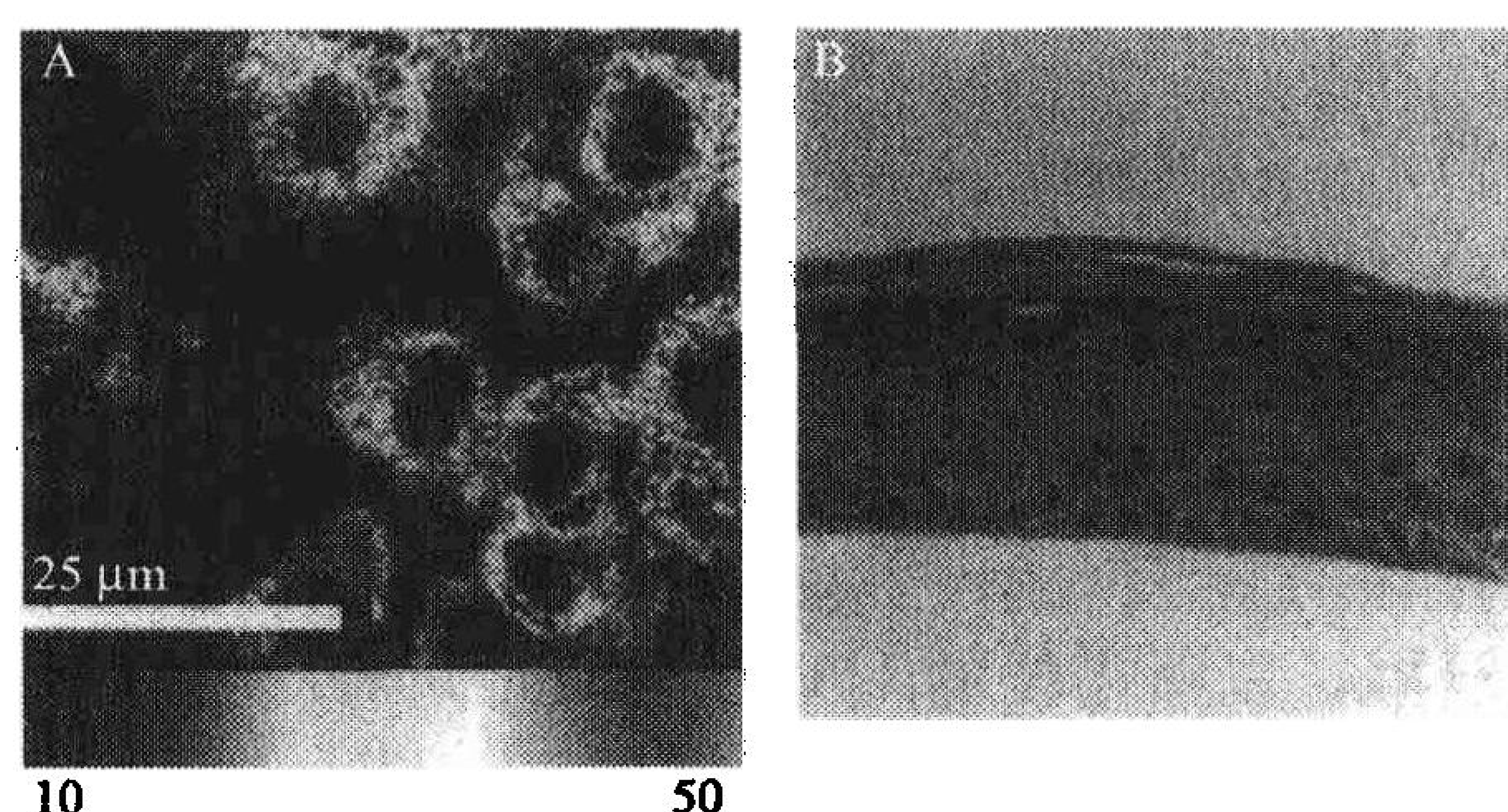


图 39.3 皮肤替代物 EpiDerm™200 显示出与离体皮肤相似的活性氧荧光影像

图像 A 是 UV 辐照（200 J/m²）后的双光子荧光强度成像。成像的深度为 85 μm，细胞为基底层的角质形成细胞。活性氧产生于细胞质内。图像 B 显示皮肤样品的组织学结果。（见文后彩图）

$$\% - 降低(z) = 100 - 100\left\{\frac{I(Z)_{样品}}{I(Z)_{对照}}\right\} \tag{1}$$

在每一表皮的深度 z，通过平均每个像素在全部图像的密度来计算荧光强度。同一皮肤的多个区域研究，计算其平均密度值 [I $(Z)_{样品}$]。同样的方法计算 I $(Z)_{对照}$，对照图像从仅与 DHR 孵育的皮肤样本获取，表明 UV 照射所产生活性氧的对照水平。

4 注意事项

（1）人体皮肤从当地的整形手术获得，该整形手术为患者所需求并事先经大学审查委员会同意。

（2）皮肤替代物 EpiDerm™200 和 EpiDerm-FT™200（MatTek Corp.，Ashland，MA）为离体组织的替代物。表皮模型 EpiDerm™200，是由正常人表皮角质形成细胞在气/液界面上培养产生的高分化的三维器官型组织，它由成分明确的无血清培养基培养。表皮/真皮模型 EpiDerm-FT™200，也是由正常人表皮角质形成细胞构成，但它在真皮及表皮连接处具有发育良好的基底膜。表皮培养在包含有活性正常人真皮成纤维细胞的胶原真皮上，NHEK 培养在气/液界面上。

（3）与离体组织不同，MatTek 公司的产品到达时是无菌的，因此应以无菌技术在闭合良好的平皿中保持剩余样品无菌，直到后期使用。如果在同一天使用所有的样品，则不需无菌技术。

（4）我们已发现离体皮肤的角质层比 EpiDerm™对 DHR 的渗透性具有更强的屏障作用。仅在离体皮肤样品的表面上应用 DHR 不一定能保证渗透足够多的 DHR 来检测出更深层的表皮和真皮的活性氧。因此，应将离体皮肤样品浸没于 DHR 中以保证荧光基团通过样本的表面和侧面进行渗透，这样 DHR 就能标记表皮及真皮层的所有层次。在 100 μmol/L 浓度的 DHR 孵育液中孵育 10 min，角质层下的 DHR 终浓度大约为 1 μmol/L[18]。

（5）利用比尔定律计算浓度：$A=\varepsilon bc$，式中，A 代表样品在 289 nm 处的吸光度；ε

为280 nm处的吸光系数［7100 L/(mol·cm)］；*b* 为比色杯的光路长度；*c* 为计算的浓度（mol/L）。

（6）我们已发现去除角质层对离体皮肤来说至关重要。角质层能明显抑制亲脂性线粒体探针的渗透性。这导致了有活力表皮层内荧光信噪比的降低，无法区分有活性与无活性的线粒体。渗透性的降低可能是由线粒体探针的疏水性引起的。

（7）使用此实验方案不能保证在 UV 辐照前、后样品的同一区域被成像。例如，角质层表面的影像可产生最大的本底信号（<10%），而有活力的表皮层与真皮层在激发波长为 785 nm 时，其本底荧光信号<5%。因此，辐照前、后不同区域的成像无明显差别。光导纤维与配备显微镜的日光模拟器结合可以使 UV 辐照样品在显微镜下完成，这就需要使用能透过 UV 光的石英盖玻片。

（赵　云译　彭代智校）

参考文献

[1] Peak, M. J. and Peak, J. G. (1986) In *The Biological Effects of UVA Radiation* (Gange, F., and Gange, R. W., eds.), Praeger, New York, pp. 42—52.

[2] Peak, M. J. and Peak, J. G. (1989) Solar-ultraviolet-induced damage to DNA. *Photodermato logy*. **6**, 1—15.

[3] Cunningham, M. L., Krinsky, N. I., Giovanazzi, S. M., and Peak, M. J. (1985) Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. *J. Free Radical Biol. Med.* **5**, 381—385.

[4] Hanson, K. M., Li, B., and Simon, J. D. (1997) A spectroscopic study of the epidermal chromophore transurocanic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2715—2721.

[5] Hanson, K. M. and Simon, J. D. (1998) Epidermal trans-urocanic acid and the UVA-induced photoaging of the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **95**, 10, 576—10, 578.

[6] Jurkiewicz, B. A. and Buettner, G. R. (1996) EPR detection of free radicals in Uvirradiated skin: mouse versus human. *Photochem. Photobiol.* **64**, 918—922.

[7] Gniadecki, R., Thorn, T., Vicanova, J., Petersen, A., and Wulf, H. C. (2000) Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress. *J. Cell. Biochem.* **80**, 215—222.

[8] Nofsinger, J. B., Liu, Y., and Simon, J. D. (2002) Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 720—730.

[9] Vile, G. F. and Tyrrell, R. M. (1995) UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 721—722.

[10] Iwai, I., Hatao, M., Nagnauma, M., Kumano, Y., and Ichihashi, M. (1999) UVA-induced immune suppression through an oxidative pathway. *J. Inv. Derm.* **112**, 19—24.

[11] Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., and Ames, B. N. (1995) Oxidative DNA damage and senscence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **92**, 4337—4341.

[12] Chen, Q. and Ames, B. N. (1994) Senescence-like growht arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **91**, 4130—4134.

[13] Brenneisen, P., Sies, H., and Scharffetter-Kochanek, K. (2002) UV-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann NY Acad. Sci.* **973**, 31—43.

[14] Vural, P., Cnbaz, M., and Selcuki, D. (1999) Plasma antioxidant defense in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **13**, 96—101.

[15] Kensler, M. L. and Thrusch, M. A. (1995) Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ. Mutagen.* **6**, 855—861.

[16] Haughland, R. P., ed. (1998) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Prober,

Eugene, OR.
[17] So, P. T. C., French, T., Yu, W. M., Berland, K. M., Dong, C. Y., and Gratton, E. (1996) Twophoton fluorescence microscopy: time-resolved and intensity imaging, in *Fluorescence Imaging and Microscopy*, vol. 137 (Herman, B., and Wang, X. F., eds.), John Wiley and Sons, New York, pp. 351—374.
[18] Hanson, K. M. and Clegg, R. M. (2002) Observation and quantification of UV-induced ROS generation in ex vivo human skin. *Photochem. Photobiol.* **76**, 57—63.
[19] CIE Central Bureau. (1997) Standard Erythema Dose, a Review. l'Eclairage, C. I. d. CIE 125.

第五部分　移植与基因治疗

第 40 章　人组织工程皮肤的体内移植

Shari Greenberg，Alexander Margulis，Jonathan A. Garlick

摘　要：组织工程的进展促进了表皮生物学体内长期研究方法学的发展。现已实现将人表皮细胞在体外构建成三维的皮肤替代物进行体内移植。本章所介绍的方法学描述了如何将器官型培养的皮肤替代物移植至裸鼠后，短期内生成具有正常组织结构、基底膜结构及屏障功能的人皮肤移植物。这些皮肤替代物是以分化良好的表皮和在胶原中分布有成纤维细胞为特征的复合培养物，移植这种已“预处理”的移植物可以加快移植组织的成活。这些方法能够制备出稳定的、与活体组织类似的人体表皮。

关键词：表皮；皮肤替代物；表皮移植；裸鼠；器官型培养

1　导言

组织工程的进展为研制皮肤及黏膜替代物的构建新途径铺平了道路。近年来，在皮肤生物学研究中，已建立了进行表皮移植两种体外培养人角质形成细胞的方法。这些技术包括表皮膜片移植[1]和器官型培养复合物移植[2]。表皮膜片移植技术是将生长于浸没培养中已铺满的表皮角质形成细胞膜片直接移植至有真皮的移植部位。第二种技术是设计包含表皮与真皮成分的一种复合组织在气-液相界面进行培养，以尽量模拟体内组织，然后进行移植。这两种方法经裸鼠移植实验比较后证明，复合组织的移植比表皮膜片移植具有更多的优点[3]，因为成功的皮肤移植，与移植物贴附于真皮、成活、分化及增殖的程度密切相关[4]，而与单层细胞膜片相比，复合型器官培养物正具备这些优点。其实这很容易理解，因为复合型器官培养物已显示出许多体内组织的特征，如完全的细胞形态学分化、迅速组装成基底膜、存在着“干细胞样”特征的细胞，以及存在着与上皮组织有联系的真皮成纤维细胞[2,5]。可见，这些复合培养物的构建可以允许已经“激活”的移植组织更快被受者所接受。本章我们将介绍由人角质形成细胞及成纤维细胞所组成的复合型器官培养物移植至裸鼠体内的移植方法。这一技术具有良好的可重复性，能在移植后短期内形成正常的皮肤组织结构和屏障功能，而且不需要对移植组织进行缝合或手术操作。所形成的稳定移植物能够直接用于人类皮肤表皮生物学的长期研究。

2　材料

(1) 4～6 周龄的雄性裸鼠（TAC：N：NHIS-nufDF，Taconic，Germantown，NY)。移植前一周购买饲养。

(2) 绷带（Alliance Health Care，Edison，NJ；cat. no. CBD1018096)。

（3）凡士林油纱布（3 in×9 in）（Sherwood Medical，Indianapolis，IN；cat. no. 8884-413605）。

（4）CO_2 箱：将器官型培养物转运至动物实验室的途中使用。

（5）麻醉：异氟烷（浸于无菌纱布上，并放入 60 ml 注射器中）；氯胺酮/甲苯噻嗪/无菌盐水溶液，每只小鼠 0.06～0.10 ml（取决于小鼠体重，用于深度镇静）。

（6）1 ml 结核菌素注射器（Monojet）。

（7）无菌外科器械包：包括弯剪、直剪、手术刀、镊子、牙科镜和直径 1.4 cm 的不锈钢活检穿孔器（Keyes 皮肤钻孔器）（Delasco Surgical Instruments，Council Bluffs，IA；cat. no. KP-14）。

（8）聚四氟乙烯树脂（特氟隆）切割板（3 cm×5 cm）：在其表面用活检穿孔器进行切割。

（9）无菌手套、口罩及手术衣。

（10）层流通风橱及消毒过的鼠笼。

3 方法

3.1 移植前的准备

（1）对所有用于移植操作的物品进行消毒。

（2）在移植当天，应对器官型培养物的质量进行评价以判断是否适合移植［见注意事项（1）］。组织冰冻切片后进行快速的苏木精-伊红染色。可供移植的形态学标准参见注意事项部分。如果培养的组织不能满足这些标准，则不能进行移植手术［见注意事项（2）］。

（3）制备新鲜麻醉液。

3.1.1 动物手术［见注意事项（3）］

（1）在 CO_2 箱中将器官型培养物转运至动物实验室，该箱应有两个带开关的通道，以便用 CO_2 替换箱内的空气。

（2）将小鼠放入装有浸泡异氟烷纱布的 60 ml 消毒空针管内，使其镇静，经腹股沟区的皮肤，行腹腔内注射 0.06～0.1 ml 氯胺酮/甲苯噻嗪/无菌盐水注射液。小鼠通常在 5～10 min 后完全镇静，可通过足垫反射验证。阴性反射是轻轻按压足垫不会引起肌肉收缩。小鼠的完全镇静状态可维持 45～60 min，足够进行移植手术。

（3）仔细估算移植部位的小鼠皮肤切除面积［见注意事项（4）］。移植物的上缘应与小鼠双前肢下的皮肤褶皱连线相一致。从小鼠的后面观看，切口应距中线的左侧几个毫米以避免伤及中线右侧的大静脉。重要的是移植区的大小要比移植物小 1 mm。如果切除太大，将会使移植边缘开放而造成移植成活率下降。

（4）用窄镊子从所选切除皮肤区域的中央提起皮肤，平顺地移动弯剪以剪除皮肤。如果出现出血或渗血，可用无菌纱布直接按压止血，然后才进行下一步操作。

（5）用手术刀从塑料嵌入小室中切取聚碳酸酯膜，从而取出器官型培养物

(图 40.1A)。这可以将嵌入小室翻转后在其底部平滑地切割，然后将培养物放在聚四氯乙烯树脂切割板上，用皮肤活检打孔器在稳固而均衡的压力下将培养物切割成适当的形状，并使其仍保持在聚碳酸酯膜上。用浸湿的镊子从聚碳酸酯膜上分离培养物，再轻轻将其滑至放有一滴培养液的口腔镜上（图 40.1B）。培养物具有足够的牵张强度，可用镊子轻柔地进行牵引操作。

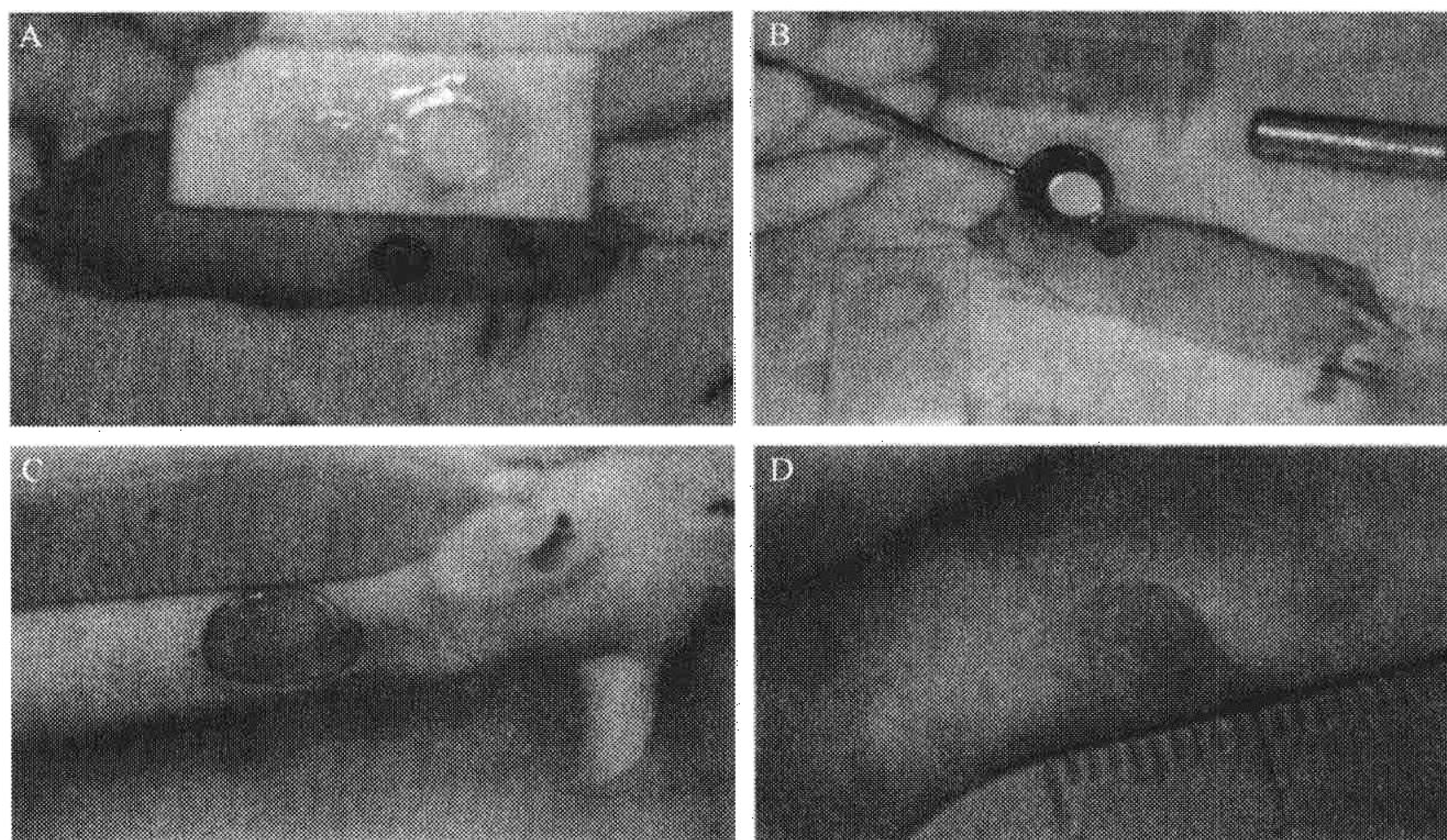


图 40.1 裸鼠的器官型培养物移植

A. 器官型培养物从其培养的嵌入小室切下并放在特氟隆板上。用 1.4 cm 直径的皮肤打孔器将培养物制成为一圆形移植物。B. 将制好的培养物从聚碳酸酯膜上分离并滑行到浸湿的口腔镜面上，然后转移到移植区的位置。C. 当放置好的移植物与邻近的小鼠组织形成对接时，就不会有小鼠结缔组织的暴露。D. 移植后 4 周移植物的外观。

（6）用镊子小心地把口腔镜面上的培养物滑行到移植部位。培养物的放置应使其边缘与移植床的切口边缘稍微重叠。操作应尽量少且尽可能轻柔，小心消除放置培养物时所造成的皮肤皱褶。同时让受皮区的皮肤轻轻舒展，并与移植物的边缘形成平滑的连接，从而不会有深部的小鼠结缔组织暴露在接口处（图 40.1C）。5 min 内不要触动小鼠，以便让移植物开始贴附于小鼠的结缔组织。

（7）用弯剪将无菌凡士林油纱布剪成比移植物直径大 2～3 mm 的圆形。用两层厚度的纱布覆盖于移植物然后用两层相互重叠的绷带完全覆盖和固定移植部位。方法是先将小鼠轻轻翻过来，再把盖有油纱的移植物置于绷带上的纱布处，然后用绷带固定有油纱的部位。翻转小鼠时应保持头部与身体后部固定，以避免移植物被移动［见注意事项（5）］。

（8）一旦小鼠放置在纱布上的位置合适，就将绷带的边缘轻柔而又有力地固定在小鼠腹部，确保移植物与移植部位非常吻合，而且在轻微的压力下保持所固定的位置。用第三个带有黏端的绷带来密封前两个绷带在腹部的包扎区以防绷带随时间的推移而松脱。随时观察小鼠直到出现苏醒的体征，才将其放入消毒的鼠笼。

3.1.2 移植后的护理［见注意事项（6）］

（1）每天检查移植部位以确保绷带完全覆盖移植区。如果任何移植物的边缘或纱布暴露，应重新包扎。

（2）一周后更换凡士林油纱，重新包扎。让小鼠爬入 60 ml 注射器，其另一端放置浸有异氟烷的纱布。注意避免小鼠与麻醉剂有任何接触，这是因为吸入任何麻醉剂的液体将导致动物死亡。小鼠将在 30 s 内镇静，并保持 1～3 min。

（3）每天观察绷带情况，一周后去除包扎。

4 注意事项

（1）因为器官型培养物的组织形态学质量是移植能否成功的主要决定因素，因此移植前对该参数进行评估非常重要。由于组织的厚度不可能用相差显微镜检测培养物的形态学，所以必须在移植前用普通显微镜评价移植物的组织学特征。这可以通过预先多设计一份培养物，然后在移植的当天对其进行冰冻组织切片来完成。适合移植的形态学标准包括组织在厚度上有 5～7 层细胞，有一层薄的角化层及基底细胞，有一定程度的极性化并呈立方形。

（2）器官型培养物移植成功的一个重要指标是移植时所具有的生长潜力。因此，必须优化条件使细胞培养物在单层期保持有大量的分裂细胞，以提高器官型培养物的生长指数。这些具有高复制能力的细胞将大大增加移植的成功性。

（3）因为裸鼠需要在无菌条件下进行操作，所以无菌技术必须贯穿在整个移植过程中。移植手术有必要按序连贯进行，这样助手就能准备好所需要的全部无菌物品，这也有助于在动物实验室对小鼠进行标记以保证有一个健康的裸鼠群。

（4）小鼠背部皮肤移植区的位置对于决定移植成活是非常重要的。如前所述，移植物的上部边缘应与小鼠双前肢下的皮肤褶皱连线相一致。这个位置上面刚好有一个脂肪垫。尽管其如何有助于移植物成功移植的原因还不清楚，但依照我们的经验该脂肪垫在移植手术时增厚。另外，从动物的后面观察切口位置应居中且略微偏向中线的左侧，这样有助于避免大静脉损伤而导致难以控制的出血。最后，切口的大小与移植物的适合度是避免移植排斥反应的重要因素。由于开放性创面的存在，小鼠可以感知到移植物的边缘。移植物与移植区边缘之间的任何间隙都会促进小鼠组织的再上皮化。为了避免这一现象，移植物应与移植床的边缘很好地吻合。这可以通过确保移植床略微比移植物稍小一点来完成。

（5）尽管器官型培养物可显示出高度的形态学分化，但通常在其移植期内缺乏屏障功能。正因如此，在移植后立即将移植物用半封闭敷料包扎就显得非常重要。如前所述，可以先用凡士林油纱覆盖刚移植的组织，然后用绷带略紧地固定其位置。为确保移植物在移植后最初几天不移位，绷带包扎必须牢固。我们还发现这样能促进移植物的血管形成。除了提供屏障功能外，绷带也应该被视为是一种加压包扎。

（6）在移植后一周内应每天检查小鼠，确保绷带敷料没有移位或松脱。当去除绷带时，最好使用拆线剪通过绷带的纱布部分剪断，这样去除包扎更容易些，而且剪刀可使

绷带脱离皮肤而不会意外伤及皮肤。如果绷带脱落造成移植物暴露超过 24 h，则移植物经表皮脱水会引起移植物干燥甚至脱落。除了屏障功能的建立，移植组织的血管化是器官型培养物移植成功的第二个关键因素，例如，内皮细胞从移植物的基底部和边缘向移植物内生长，以及血管化的程度似乎因移植物的不同而异。然而，非常清楚的是，支持性血管网的建立需要几天的时间，在此期间保持移植物的屏障功能是很重要的。

（王 勇 译 彭代智 校）

参考文献

[1] Barrandon, Y., Li, V., and Green, H. (1998) New techniques for the grafting of cultured human epidermal cells onto athymic animals. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 315—318.

[2] Kolodka, T. M., Garlick, J. A., and Taichman, L. B. (1998) Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus transduced keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4356—4361.

[3] Cooper, M. L., Andree, C., Hansbrough, J. F., Zapata-Sirvent, R. L., and Spielvogel, R. L. (1993) Direct comparison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes and fibroblasts to an epidermal sheet graft containing human keratinocytes on athymic mice. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 811—819.

[4] Carver, N., Navsaria, H. A., Fryer, P., Green, C. J., and Leigh, I. M. (1993) Restoration of basement membrane structure in pigs following keratinocyte autografting. *Br. J. Plast. Surg.* **46**, 384—392.

[5] Andriani, F., Margulis, A., Lin, N., Griffey, S., and Garlick, J. A. (2003) Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 923—931

第41章　利用活体电穿孔进行表皮定向的基因转移

Hiroki Maruyama，Jun-Ichi Miyazaki，Fumitake Gejyo

摘　要：皮肤由于其易接受性而成为基因转移的重要靶标。最近，我们展示了活体电穿孔的方法在大鼠腹部皮肤进行质粒 DNA 的递送。采用板叉型电极能有效地进行皮肤定向基因转移的基因投递。通过电极递送了 8 次 12～24 V、50 ms 的电脉冲。皮肤注射 pCAGGS-*lacZ* 的实验显示，pCAGGS-*lacZ* 基因转移后的第 1 天 *lacZ* 基因表达在表皮的最上部细胞层（角质层、颗粒细胞层及棘细胞层）；第 7 天则在皮下肌肉层。由于基因转移操作而导致的轻度皮肤损害在第 1 天明显而第 7 天后消失，表明以低电压活体电穿孔进行质粒 DNA 的转移是短期皮肤定向基因转移的一种有用方法。

关键词：电穿孔；基因转移；皮肤；质粒 DNA；表皮；电极；CAG 启动子

1　导言

皮肤由于其易于直接进行操作和临床监测而成为一种受到关注的基因转移组织。通过注射[1,2]和局部应用[3]，直接在活体将质粒 DNA 转移至皮肤已有报道。皮内注射的质粒 DNA 可迅速穿过表皮与真皮连接，被表皮的角质形成细胞摄取和表达[4]。注射 3 天后[3]表皮失去了活跃的转基因表达，这对于临床应用来说时间太短，而且皮肤摄取和表达 DNA 的效率低于肌肉[5]。因此，皮肤定向的质粒 DNA 转移已集中在两个主要的治疗应用点上：基因免疫[6,7]和生物学反应调节物的表达，以治疗皮肤疾病[4]。最近，我们展示了将活体电穿孔的方法用于大鼠腹部皮肤进行质粒 DNA 的递送[8]。本章将详细地描述用活体电穿孔的方法将质粒 DNA 转移到表皮的实验方案。

2　材料

2.1　实验动物

（1）大鼠：我们使用 9 周龄的雄性 Wistar 大鼠（购自 Charles-River Japan Inc. Tokyo，Japan）。其他年龄段或品系的大鼠或小鼠给予同样处理。

（2）麻醉剂：乙醚。

（3）配有盖子和陶瓷板的干燥器。

2.2　质粒 DNA

（1）质粒载体：pCAGGS。该质粒载体必须包含一个在皮肤中活化的表达单位。我们

已成功地使用过 pCAGGS 载体[9]。为了评价基因转移的效率，我们采用了把大肠杆菌（*E. coli*）*lacZ* 基因插入唯一的 *Eco*RI 酶切位点构建而成 pCAGGS-*lacZ* 载体[10]。该酶切位点位于 CAG 杂合启动子（巨细胞病毒即早增强子/鸡 β-肌动蛋白杂合）和 pCAGGS 兔 β-球蛋白基因 3′-侧翼序列之间。pCAGGS 载体可通过电子邮件申请，由 Miyazaki Jun-ichi 提供［见注意事项（1）；e-mail：jimiyaza@nutri. med. osaka-u. ac. jp］。

（2）感受态细胞：pCAGGS 质粒是以高拷贝数的 pUC 13 质粒为基础构建而成，很容易生长于 *E. coli* DH 5α 或其他菌株中。

（3）无内毒素大量质粒抽提试剂盒（endofree plasmid Giga Kit）（Qiagen，Hilden，Germany；cat. no. 12391）。

（4）磷酸盐缓冲盐液（PBS），pH 7.4（Gibco，Invitrogen，Grand Island，NY；cat. no. 10010-031）。

2.3 皮内 DNA 注射及电穿孔

（1）化学脱毛剂，Divele（Shiseido Cosmenity，Tokyo，Japan；cat. no. 4901872504701 50470）。

（2）配有 27G 针头的一个 1ml 容量注射器（Terumo，Tokyo，Japan；cat. no. SS * 01T27139）。

（3）板叉型电极：CUY663B 型（NEPA Gene，Chiba，Japan）为一副不锈钢的镊子，一侧是长 10 mm、宽 5 mm 的矩形平板，另一侧是由长 10 mm、直径 0.5 mm 和间距 2.5 mm 的三个直针组成的叉形物（图 41.1A）。

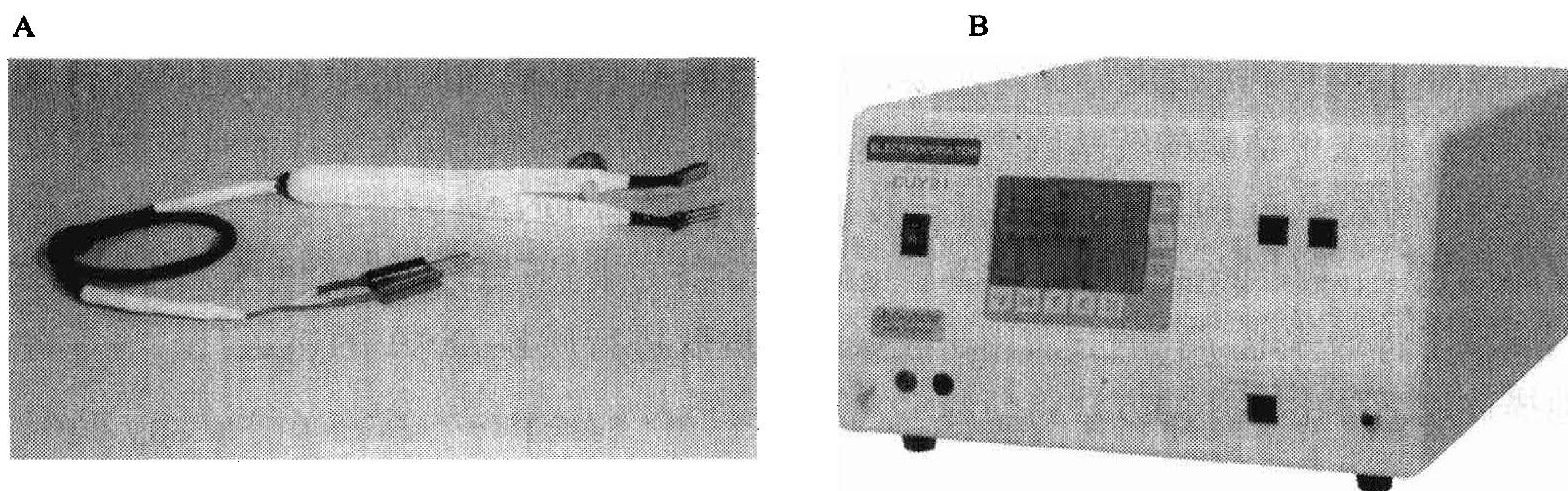


图 41.1　板叉型电极和电脉冲发生器

A. 板叉型电极（CUY663B：NEPA Gene，Chiba，Japan）为一副不锈钢的镊子，一侧是一个长 10 mm、宽 5 mm 的矩形平板，另一侧是由长 10 mm、直径 0.5 mm 和间距 2.5 mm 的三个直针组成的叉形物。
B. 电脉冲发生器（CUY21EDIT 方形波电穿孔仪：NEPA Gene）。

（4）角蛋白乳膏一只（Fukuda Denshi，Tokyo，Japan；cat. no. OJ-01）。

（5）活体电穿孔所需要的电脉冲发生器为方形波，且电脉冲期间能维持恒定电压。一台电脉冲发生器为 T820 型方形波电穿孔仪（BTX，San Diego，CA）并联合一台 MVC540R 型图像脉冲分析仪（BTX）。另外一台电脉冲发生器为 CUY21EDIT 型方形波电穿孔仪（NEPA Gene），还配备有一台图像脉冲分析仪（图 41.1B）。

2.4 基因转移效率的评价

（1）用无内毒素的大量质粒抽提试剂盒（Qiagen）制备 pCAGGS-*lacZ* 质粒，以 2 μg/μl的浓度溶于 PBS 中。

（2）磷酸盐缓冲液（PB，pH 7.4）。将一份 0.1 mol/L NaH_2PO4（Wako pure chemicals，Osaka，Japan；cat. no. 192-02815）和三份 0.1 mol/L Na_2HPO_4（Wako Pure Chemicals；cat. no. 196-02835）混合成 PB，调节其 pH 为 7.4。

（3）含 4%多聚甲醛的 PBS（Wako Pure Chemicals；cat. no. 160-00515）。

（4）溶于蒸馏水的 1 mol/L $MgCl_2$，例如，$MgCl_2$（Wako Pure Chemicals；cat. no. 136-03995）2.03 g，加蒸馏水至 10 ml。4℃保存于暗处。

（5）溶于蒸馏水的 300 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$，例如，$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$（Wako Pure Chemicals；cat. no. 165-03745）1.45 g，加蒸馏水至 10 ml。4℃保存于暗处。

（6）溶于蒸馏水的 300 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$，例如，$K_3Fe(CN)_6$（Wako Pure Chemicals；cat. no. 161-03725）0.99 g，加蒸馏水至 10 ml。4℃保存于暗处。

（7）10% Igepal CA-630（Sigma Chemical Co.，St. Louis，MO；cat. no. I 3021）的 PBS 溶液，4℃保存于暗处。该试剂化学作用上与 N P-40 无区别。

（8）40 mg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷（X-gal；Takara，Shiga，Japan；cat. no. 9031）溶于二甲基亚砜（Wako Pure Chemicals；cat. no. 046-21981），4°C 保存于暗处。

（9）O C T 组织包埋剂（Tissue-Tek，Sakura fine technical，Tokyo，Japan；cat. no. 06441）。

（10）干冰与丙酮。

（11）恒冷切片机，CM 1850（Leica microsystems Nussloch GmbH，Nussloch，Germany）。

（12）包被 3-氨基丙基三乙烯乙醚的载玻片（Matsunami glass，Osaka，Japan；cat. no. S-8444）。

（13）1.5% 戊二醛（Nacalai tesque，Kyoto，Japan；cat. no. 17003-92）溶于 PB 中。

（14）核坚固红，Kernechtrot 染液（Muto pure chemicals，Tokyo，Japan；cat. no. 4087）。

（15）封固剂，malinol（Muto Pure Chemicals；cat. no. 2009）。

3 方法

我们描述了一种通过活体电穿孔将基因转移至大鼠腹部皮肤的方法。有必要对这一方法进行修改，只有这样才能再用于其他部位或其他种属的皮肤。

3.1 质粒 DNA 的制备

（1）用无内毒素大量质粒抽提试剂盒（Qiagen）提取并纯化质粒 DNA［见注意事项（1）］。

(2) 将 DNA 溶解于 Tris-乙烯二胺四乙酸（TE）缓冲液中，通过检测其在 260 nm 和 280 nm 波长的吸光度值来评估 DNA 的含量及质量。于−20℃保存 DNA。

(3) 注射前将 DNA 用 PBS 稀释为 2 μg/μl。

3.2 皮内注射 DNA 及体内电穿孔

(1) 在基因转移前几天，用化学脱毛剂如 Divele [见注意事项（2）] 除去腹部目标区域的毛发。

(2) 在配有盖子和陶瓷板的干燥器内用乙醚麻醉大鼠。

(3) 将叉型电极以平行于皮肤表面的方向插入皮肤。

(4) 用连接一个 1.0 ml 注射器的 27G 针头皮内注射 DNA（每个部位 100 μg）到电极上方皮肤的中央区域 [见注意事项（3）]。

(5) 从柱状角蛋白乳膏管中挤出大约长 5 mm、直径 5 mm 的乳膏。用角蛋白乳膏涂抹矩形板电极以减少皮肤的电阻。然后，将皮肤夹入矩形板和叉形电极之间 [见注意事项（4）]。矩形板电极及皮肤表面均涂盖有角蛋白乳膏。多余的角蛋白乳膏不会干扰下面的电穿孔步骤。

(6) 通过检测两个电极之间的电阻以确保正确地插入皮肤或夹在皮肤表面，通常应低于 300Ω。

(7) 如前所述，用电脉冲发生器发送电脉冲，用图形脉冲分析仪监测[8]。4 个 50 ms的电脉冲后跟随另外 4 个极性相反的脉冲以每秒 1 个脉冲的速率施加到每个注射部位。

3.3 电转移效率的评价

在用电穿孔方法导入感兴趣的基因前，通过报告基因验证实验步骤的效果是重要的。为了这一目的，我们用携带能表达 β-半乳糖苷酶的报告基因质粒 pCAGGS-*lacZ*。

3.3.1 *LacZ* 基因转移

(1) 将浓度为 2 μg/μl 的 100 μg pCAGGS-*lacZ*（用 PBS 配制）注射到麻醉大鼠的皮肤内，按 3.2 的描述以 12 V 或 18 V 的电压施予电脉冲。

(2) 注射后的次日或第 7 天，在配有盖子和陶瓷板的干燥器内用乙醚麻醉处死大鼠。

3.3.2 *β*-半乳糖苷酶染色

按以前所描述的方法进行 X-gal 染色[8,11]。

(1) 收集皮肤用于 X-gal 染色，用 O C T 复合物包埋皮肤，再用干冰和丙酮的混合物进行冷冻。

(2) 用恒冷切片机将皮肤切成一系列 5 μm 厚的切片，然后置于 3-氨基丙基三乙烯乙醚包被的载玻片上。

(3) 用 PB 配制的 1.5%戊二醛（pH 7.4），在室温下固定切片 10 min，用冷 PBS 洗三次 [5 min/次，见注意事项（5）]。

(4) 37℃下将切片在 X-gal 染液中孵育 3 h。X-gal 染液包括 1 mg/ml X-gal、2 mmol/L $MgCl_2$、5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$、5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$，以及溶于 PBS 的 0.5% Igepal CA-630。60 ml 的 X-gal 染液具体配制如下。

a. 1 mol/L $MgCl_2$，120 μl。

b. 300 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$，1002 μl。

c. 300 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$，1002 μl。

d. 溶于 PBS 的 10% Igepal CA-630，3 ml。

e. 40 mg/ml X-gal 溶于二甲基亚砜，1.5 ml。

f. 加蒸馏水至 60 ml。

(5) 用核坚固红室温下复染 4 min，干片 1 h，用二甲苯透明三次。用一滴封固剂封住盖玻片。

(6) 在光学显微镜下观察切片。β-半乳糖苷酶在第 1 天表达在表皮的上部细胞层（角质层、颗粒层和棘细胞层）（图 41.2A），第 7 天在皮下肌肉层（图 41.2B）。

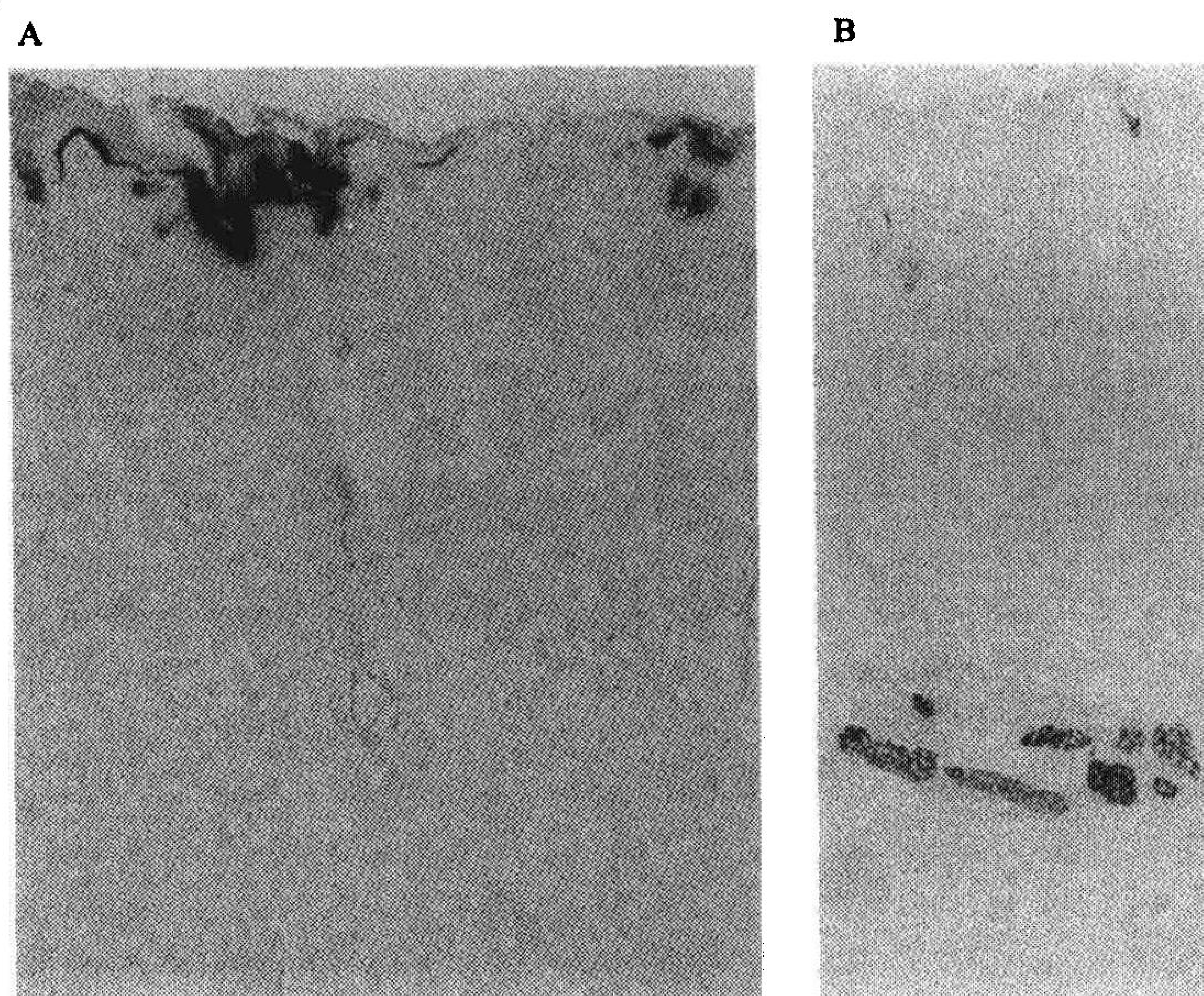


图 41.2　18 V 电压下 pCAGGS-*lacZ* 基因电穿孔转移后第 1 天（A）和第 7 天（B）β-半乳糖苷酶的表达

β-半乳糖苷酶在第 1 天表达在表皮的上部细胞层（角质层、颗粒层和棘细胞层）(A，250×)，第 7 天表达在皮下肌肉层（B，70×）。

4　注意事项

(1) 应制备无内毒素的质粒 DNA。内毒素污染可引起局部的免疫反应，进而导致基因表达的早期丢失或影响实验结果。推荐使用 Qiagen 公司的无内毒素试剂盒（Qiagen；cat. no. 12362，12381，12391）。

(2) 为了避免化学脱毛剂对皮肤的可能损害，我们建议在基因转移的前几天，除去目标区域的毛发。

(3) 在正式实验前，我们推荐你用某种染料（如台盼蓝）对麻醉大鼠进行多次皮内注射，以证实其可重复性。

(4) 板叉型电极（CUY663B：NEPA Gene）可覆盖的区域相对较小（50 mm^2），DNA 溶液的注射量不应超过 50 μl。

(5) 对于 X-gal 染色来说，避免内源性 β-半乳糖苷酶所造成的背景染色是很重要的。在所有除少数特殊的真核细胞，其溶酶体酶仅在酸性条件下活化，并催化 β-半乳糖苷键水解，而在中性 pH 下则无活性。但是大肠杆菌的 β-半乳糖苷酶却在中性 pH 下活化[12]。因此，我们用 pH 7.4 的 PBS 来检测 *lacZ*。

致　谢：作者感谢 NEPA 基因有限公司的 Y. Hayakawa 和 Unique Medical Imada 有限公司的 Y. Imada 的技术协助。

（王　勇 译　彭代智 校）

参考文献

[1] Hengge, U. R, Chan E. F., Foster, R. A., Walker, P. S., and Vogel, J. C. (1995) Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nat. Genet.* **10**, 161—166.

[2] Hengge, U. R., Walker, P. S., and Vogel, J. C. (1996) Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J. Clin. Invest.* **97**, 2911—2916.

[3] Li, L. and Hoffmann, R. M. (1995). The feasibility of targeted selective gene therapy of the hair follicle. *Nat. Med.* **1**, 705—706.

[4] Vogel, J. C. (1999) A direct in vivo approach for skin gene therapy. *P. Assoc. Am. Phys.* **111**, 190—197.

[5] Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., et al. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465—1468.

[6] Raz, E., Carson, D. A., Parker, S. E., Parr, T. B., Abai, A. M., Aichinger, G., et al. (1994) Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9519—9523.

[7] Fan, H., Lin, Q., Morrissey, G. R., and Khavari, P. A. (1998) Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat. Biotechnol.* **17**, 870—872.

[8] Maruyama, H., Ataka, K., Higuchi, N., Sakamoto, F., Gejyo, F., and Miyazaki, J. (2001) Skin-targeted gene transfer using in-vivo electroporation. *Gene Ther.* **8**, 1808—1812.

[9] Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193—199.

[10] Aihara, H. and Miyazaki, J. (1998) Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat. Biotechnol.* **16**, 867—870.

[11] Maruyama, H., Higuchi, N., Nishikawa, U., Hirahara, H., Iino, N., Kameda, S., et al. (2002) Kidney-targeted naked DNA transfer by retrograde renal vein injection in rats. *Hum. Gene Ther.* **13**, 455—468.

[12] Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) β-galactosidase, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., vol. 3 (Argentine, J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 17.97—17.99.

第 42 章　毛囊的基因及干细胞治疗

Robert M. Hoffman

摘　要：毛囊是一个非常复杂的含有多种细胞类型的皮肤附件。毛囊在机体生命过程中经历着不断的循环，包括生长和依赖特殊干细胞生长的再吸收。本章讨论了通过基因和干细胞靶向治疗改变毛囊的特性，尤其是毛的干性质，并介绍了毛囊基因治疗的给药系统，如脂质体和病毒载体。本章还探讨了毛囊干细胞的特性，尤其是其多潜能特性。
关键词：毛囊；脂质体；腺病毒；基因；干细胞

1　导言

毛囊是一个复杂的皮肤附件，由几种不同特性的细胞所形成的 6 个同心圆样结构组成，这些细胞可产生高度特化的蛋白质（图 42.1）。毛囊的功能至少部分受到邻近的间充质真皮乳头调节（图 42.1）。毛囊通过三个主要分期不断循环：毛发生长初期（anagen）即生长期、毛发生长中期（catagen）即退化期和毛发生长终期即休止期（telogen）。每期均受特殊的分子机制调节，因此毛囊可作为许多治疗的潜在靶点[1]。

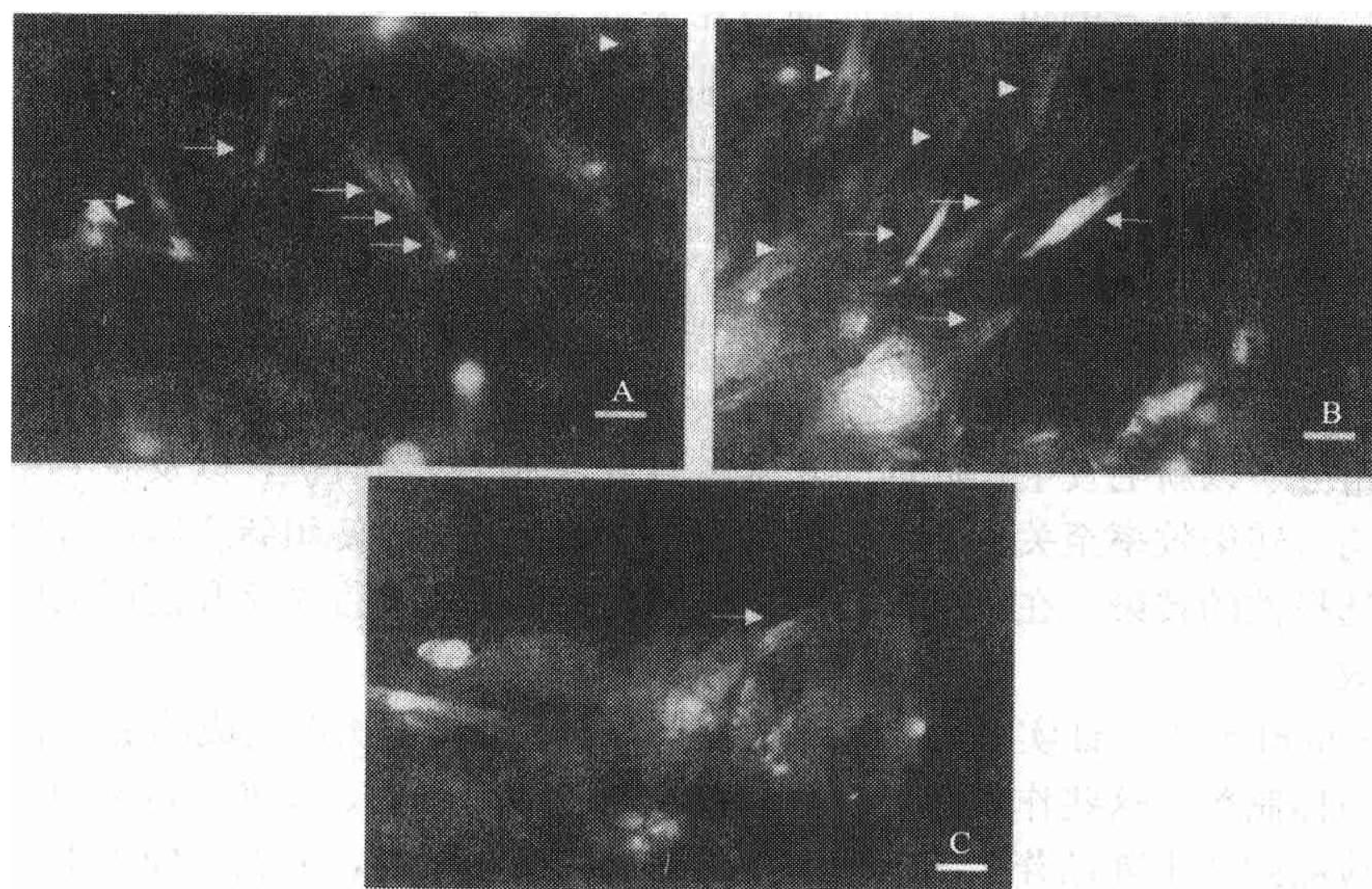


图 42.1　在腺病毒-GFP 转染的移植皮肤毛干中的 GFP 显影

A. 移植 8 d 后，放大倍数 32×，标尺 3 mm。B. 治疗后 12 d，放大倍数 80×，标尺 1 mm。C. 治疗后 12 d，放大倍数 63×，标尺 1.5 mm。A～C 为表面观。箭形指示 GFP 阳性区域，箭头指示 GFP 阴性区域（自发荧光）。（见文后彩图）

1.1 毛囊靶向选择性基因治疗的可行性[2]

毛囊的特异性治疗取决于该附件的选择性靶点。我们已经在海绵-凝胶基质上建立了一个完整的毛发生长皮肤的组织培养方法（参考文献［3］～［8］，美国专利 5 849 579 和 6 399 380，欧盟专利 573 606，日本专利 2 950 519）。我们之前已经在组织培养的皮肤中发现，脂质体能选择性地定向毛囊，并对小分子、大分子均能进行递送（参考文献［5］～［8］，美国专利 5 641 508，5 753 263，5 914 126，5 965 157，6 224 901，6 261 776，6 733 776；加拿大专利 2 159 626；欧洲专利 692 972；日本专利 2 950 520）。其他实验室已经证实了脂质体能选择性地给毛囊靶向给药[9]。26 年前，我们介绍了在脂质体中包入 DNA 的技术以用于基因治疗[10]。在小鼠局部应用包裹基因的脂质体之后，我们通过 DNA-脂质体将 *lacZ* 报道基因选择性地导向毛囊。这些结果显示，具有高度选择性和安全性的基因治疗对毛发疾病是切实可行的。

局部应用脂质体-*lacZ* 之后，X-gal 底物将生成毛发的毛基质细胞染成蓝色，表明这些分布在皮脂腺开口以下毛囊球部和隆突部的细胞可以表达 *lacZ* 基因[2]。隆突部被认为含有毛囊干细胞[11,12]。许多毛囊被染色，表明转染的效率非常高。毛囊以外的其他真皮或表皮的细胞没有被转染。毛基质细胞可见广泛的 *lacZ* 基因表达。局部应用 *lacZ* 裸基因不会导致基因转移，未接受脂质体-*lacZ* 治疗动物的毛囊不会出现 *lacZ* 的染色。

这些结果显示，脂质体可以将基因选择性地导向到毛囊中最重要的细胞。这是迄今在体内观察到的最具选择性的基因靶向技术[2]。局部应用脂质体可以实现选择性的基因定向转移，表明毛基质细胞和毛囊干细胞可作为靶标有可能通过递送和表达酪氨酸蛋白酶基因[13,14]来恢复毛发颜色，也可能通过相关的基因来恢复毛发生长。局部应用脂质体基因定向的高度选择性促进了其实用性和安全性操作规程的发展。

1.2 对生长期人毛囊细胞进行有效的基因转送[15]

人头皮毛囊较大且通常处于生长期，相反，小鼠毛囊较小而大部分处于休止期[15,16]。Domashenko 等[17]的实验显示，无论是在小鼠还是人头皮异种移植模型中，局部应用包裹 *lacZ* 基因的脂质体之后，人毛囊细胞均获得有效的转染。这些作者发现，脂质体的组分、以新毛发生长周期的开始作为脂质体的应用时机，以及脱毛和维甲酸预处理等，均对转染效率至关重要。他们发现在生长期开始时使用脂质体，可导致人毛囊基质细胞选择性的转染。在脂质体应用之前对皮肤移植物进行脱毛和使用维甲酸可显著增加转染效率。

Domashenko 等[17]证实一种由两种阳离子脂质按 1∶1 比例组成的混合物 pFx-1 是最好的脂质体制剂。这些作者还发现只有在脱毛后第 1、2、3 天进行转染的小鼠，才能在毛囊中检测到 β-半乳糖苷酶的表达。在脱毛后的头 3 天内，毛囊正处于生长期的最早阶段[18]。在生长期开始时，大多数表达 β-半乳糖苷酶的细胞是位于表皮向下生长前沿的基质角质形成细胞[17]，而表皮或真皮内均无明显活性。在末次转染后多达 4 d 之久，可检测到 β-半乳糖苷酶的活性。这些作者[17]注意到，在生长期开始时，毛囊内的祖细胞正在增殖并容易受到影响，可能的原因是此时毛囊缺乏毛根内鞘。正常情况下在生长

期的晚期，毛根内鞘可以阻止周围物质的进入。

为证实是否能通过局部应用脂质体转染 DNA 到人毛囊，Domashenko 等[17]使用了人头皮异种移植到免疫缺陷小鼠的模型[19,20]。大部分的毛囊均处于生长期，正在生成毛干。作者对异种移植物进行脱毛和（或）维甲酸预处理以增加处于生长期开始阶段的毛囊数量，然后使用含 β-半乳糖苷酶（β-gal）基因的 pFx-1 脂质体。仅在生长期开始阶段的毛囊中发现转染细胞。β-gal 阳性细胞是位于表皮向下生长前沿的基质角质形成细胞。转染细胞主要是角质形成细胞。毛囊内的其他细胞、皮脂腺或表皮均不表达 β-gal。真皮及皮下脂肪也为 β-gal 阴性。这些结果显示，经局部应用脂质体后人头皮处于生长初期的毛囊可选择性表达所转入的基因［见注意事项（1)］。

1.3 影响毛发生长的特异性基因[1]

Alexeev 等使用 RNA-DNA 嵌合的寡核苷酸来纠正小鼠酪氨酸酶基因的白化病点突变[21]。由于同源重组和错配 DNA 修复，嵌合寡核苷酸可以纠正基因的点突变，在此情况下，被纠正的点突变以可遗传的方式恢复酪氨酸酶活性及相应的黑色素合成，从而使白化病小鼠产生出有色素的毛干。局部的基因纠正至少可以保持 3 个月，提示黑色素细胞的前体已经被转换。可以用脂质体和皮内注射给小鼠递送嵌合寡核苷酸。当荧光标记的嵌合寡核苷酸以脂质体制剂的形式局部应用时，它们能穿过角质层，检测到的荧光主要在毛囊及表皮中。皮内注射的效率更高，但递送的特异性较低，真皮和毛囊均可见到荧光。所观察到的低转染效率对于美容上成功恢复毛发的色素来说是一个难题，因为只有位于毛囊球部深处的少量黑色素细胞发生转化，才可使单个毛干着色。由于仅是部分恢复将不能得到理想的结果，按照目前的效率来说，从遗传上来恢复体内的色素仍将是一个困难的任务。

然而，毛发生长的靶向基因治疗也许要求不高，因为甚至部分的恢复也有获得满意结果的可能。在这一方面，Sato 等[22]的近期研究显示，C57BL/6 小鼠用腺病毒载体递送音猬因子（Shh）基因可促进生长期毛囊的发育及毛干的生成。此外，与全身脱毛有关的人无毛基因已被克隆[23]，这可能成为多种具有潜在治疗作用基因中的另一种基因。

1.4 提高毛囊基因修饰效率的离体实验方法

离体实验[24,25]方法可达到接近 100%的基因转移，可应用于毛囊，这使得最近的一项发现显得更为重要。该发现显示，取自男性成人头皮的毛囊真皮鞘细胞可以形成一种新的真皮乳头和毛囊，若移植到一无血缘关系的女性皮肤上则可长出毛干[25]。此种类型的移植具有毛囊细胞的所谓的免疫赦免优点，即可防止它们被排斥，并具有毛囊真皮鞘细胞的可能全能性或可诱导性特点[25]。目前，通过移植毛囊真皮鞘细胞和其他毛发移植操作来形成毛囊的方法已经用于临床或在研发中，这会带来对离体毛囊进行基因改变后重新回植，甚至是移植给不是供体的其他个体的多种可能性。

我们最近描述了一种用于毛囊的高效遗传修饰技术，它可使移植到裸鼠的遗传修饰小鼠皮肤在处于生长的毛干中高转基因表达[26]。将维持在组织培养中的小鼠毛囊生长

期皮片用腺病毒-绿色荧光蛋白（GFP）进行高效率的遗传修饰。先对组织培养的皮片进行胶原酶处理，这可使腺病毒-*GFP* 基因易于进入毛囊，从而提高转导效率；然后将这些皮片移植到裸鼠身上，可以在多达 75%的毛囊中检测到 GFP 荧光[26]。GFP 荧光可见于毛球的根鞘细胞和基质细胞。大多数毛囊可以生成携带 GFP 荧光的毛干。GFP 主要在毛囊表达，在表皮上层和真皮成纤维细胞的表达程度较低。这项新技术是首次对毛干进行的有效遗传修饰。

已转导的 *GFP* 基因可以持续表达于移植皮肤的毛囊中。当含 *GFP* 基因的皮肤移植到裸鼠后，用 RT-PCR 可检测到其体内含有 GFP 特异性 mRNA。

经胶原酶处理过的皮肤漂浮培养中，表皮和真皮两者均为离体基因递送系统的靶点，这至少可以部分地解释基因递送所获得的高效率。胶原酶处理可使毛囊更完全地暴露在 GFP 腺病毒下，因此高效率也是胶原酶处理的结果。这种离体的方法首次显示了所递送的转基因表达，可出现在重新植入体内的正在生长的大量毛干中［见注意事项（1）］。

1.5 基因修饰毛囊以产生治疗性的蛋白质[1]

毛囊具有很强的蛋白质产生能力，这一特点可用于体内和体外基因治疗，以产生蛋白质分子，但这些分子可以不是直接参与毛干生长和色素形成的。最近的一项研究显示，局部应用裸露的和脂质体包裹的肝炎表面抗原（HBsAg）质粒载体，均可导致抗原特异性免疫应答[27]。这种局部疫苗基因治疗有赖于正常毛囊的存在，这提示基因靶向和基因产物产生均发生在毛囊。我们可以想象这种毛囊工厂有着多个方面的应用。

1.6 毛囊干细胞的显像及分离[28]

属于中间丝蛋白的巢蛋白（nestin）是中枢神经系统（CNS）祖细胞的独特性标志物。在巢蛋白调节序列控制下，GFP 可以对这些中枢神经系统的干细胞进行选择性地标记。在巢蛋白-GFP 转基因小鼠的毛囊生长期早期阶段，显示 GFP 荧光的巢蛋白表达细胞持续出现在毛囊上部，在毛囊隆突部的皮脂腺的下面，这被认为是毛囊外根鞘干细胞的所在位置。这种在隆突部的相对较小、椭圆形又表达巢蛋白的细胞围绕在毛干周围，并通过短树突互相连接。毛囊中表达巢蛋白细胞的精确定位随毛发周期而发生改变（图 42.2）。在休止期和生长期的初期，GFP 阳性细胞主要分布在隆突部，然而，在生长期的中、晚期，表达 GFP 的细胞定位于外根鞘上部和隆突部，而不是毛发的基质球部。这些现象显示表达巢蛋白的细胞形成了外根鞘。免疫组化染色的结果显示，巢蛋白、GFP、角蛋白 5/8 和角蛋白 15 共同定位在毛囊隆突部细胞、外根鞘细胞和皮脂腺的基底细胞。这些数据表明位于毛囊隆突部 GFP 标记的表达巢蛋白的细胞确实是毛囊外根鞘的祖细胞。神经干细胞和毛囊干细胞两者均表达巢蛋白这种独特的蛋白质提示存在一种可能的联系［见注意事项（2）］[28]。GFP 的表达使毛囊干细胞的特异性分离成为可能，后者可作为基因治疗的靶点。

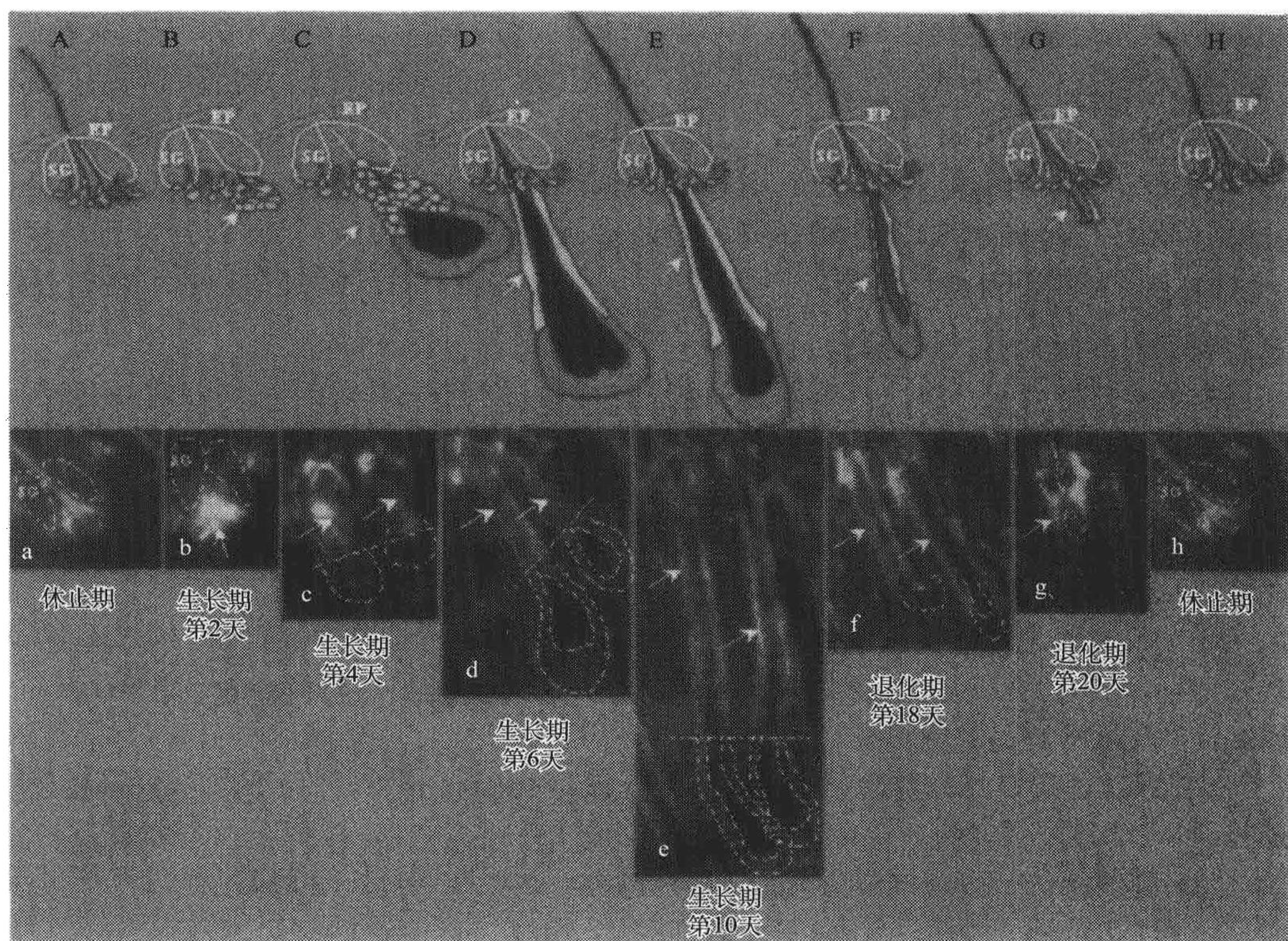


图 42.2 毛发生长周期中的毛囊干细胞[28]

图的上部：显示毛囊周期每一阶段巢蛋白-GFP 干细胞的位置。图的下部：A. 表达巢蛋白-GFP 的毛囊干细胞（红箭标所指）位于休止期的毛囊隆突部。B. 脱毛诱导生长期后 2 天，新的毛囊细胞（白箭标所指）直接从隆突部表达巢蛋白-GFP 的干细胞形成。C、D、E 分别为脱毛诱导生长期后第 4、6、10 天。F、G 分别为脱毛后第 18、20 天，表达巢蛋白-GFP 的外根鞘细胞位于毛囊上 2/3 部位（白箭标所指），包括外根鞘表达巢蛋白-GFP 细胞的退化期毛囊正经历退化和变性，隆突部表达巢蛋白-GFP 的干细胞持续存在。H. 毛囊循环至另一个休止期。EP，表皮；SG，皮脂腺。（见文后彩图）

2 材料

2.1 毛囊基因治疗

（1）*lacZ* 基因（pM-MuLV-SV-*lacZ*；获自 Joshua R. Sanes，Washington University，St. Louis，MO）。

（2）Promega Wizard™ Megaprep DNA 纯化系统（Promega，Madison，WI；cat. no. A7300）。

（3）磷酸卵磷脂：胆固醇：磷脂酰乙醇胺（Avanti Polar Lipids，Alabaster，AL）。

（4）BALB/c 小鼠（Harlan Sprague Dawley，San Diego，CA；cat. no. BALB/c）。

（5）X-gal 染色液（Promega Corporation，Madison，WI；cat. no. V3941）。

(6) 含 GFP 的腺病毒载体 pQBI-AdCMV5GFP（Qbiogene Inc.，Montreal，Quebec，Canada；cat. no. AES0525）。

(7) C57BL/10 小鼠（8 周龄；Charles River Laboratories，Wilmington，MA；cat. no. C57BL/10）。

(8) C57BL/6-Tyr＜c-2J＞/＋小鼠（8 周龄；Charles River Laboratories，Wilmington，MA；cat. no. C57BL/6-Tyr＜c-2J＞/＋）。

(9) CD-1 裸小鼠（7 周龄；Charles River Laboratories，Wilmington，MA；cat. no. CD-1 nude）。

(10) 氯胺酮（50 mg；Burns Veterinary Supply，Vancouver，WA；cat. no. Ketaset）。

(11) 含 10%胎牛血清（FBS）的 RPMI 1640（Pittsburgh，PA；cat. no. 10-040-CV）。

(12) I 型胶原酶（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO；cat. no. C0130）。

(13) 尼康荧光显微镜（Nikon，Tokyo，Japan）。

(14) 莱卡 LZ12 型荧光立体显微镜（Leica Inc.，Deerfield，IL；cat. no. LZ12）。

(15) 长通滤片 GG475（Chroma Technology，Brattleboro，VT；cat. no. GG475）。

(16) C5810 型三芯片冷色 CCD 照相机（Hamamatsu Photonics Systems，Bridgewater，NJ；cat. no. C5810）。

(17) 莱卡 CM1850 型恒冷切片机（Hacker Instruments，Inc.，Fairfield，NJ；cat. no. CM1850）。

(18) 载玻片（Fisher Scientific，Pittsburgh，PA；cat. no. 12-550-12）。

(19) Tri 试剂（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO；cat. no. T9424）。

(20) AMV 逆转录酶（Stratagene，San Diego，CA；cat. no. 600081）。

2.2 表达 GFP 毛囊的显影

(1) EGFP 转基因小鼠携带有在巢蛋白第二内含子的增强子控制之下的增强绿色荧光蛋白（EGFP）（获自 Grigori N. Enikolopov，Ph. D.，Cold Spring Harbor Laboratory，enik@cshl. org）。

(2) 莱卡 CM1850 型恒冷切片机（Leica Inc.，Deerfield，IL；cat. no. CM1850）。

(3) MRC-600 型共聚焦成像系统（Bio-Rad，Hercules，CA；MRC-600）。

(4) DAKO ARK 动物研究试剂盒（nestin and keratins；DAKO，Carpinteria，CA；cat. no. K3954 [15 mL] or K3955 [110 mL]）。

(5) DAKO EnVision 双重染色系统（DAKO，Carpinteria，CA；cat. no. K1395）。

(6) 巢蛋白单克隆抗体（Rat 401；DSHB at the University of Iowa，Iowa City，IA，cat. no. RAT401）。

(7) 角蛋白 5/8 单克隆抗体（MAB3228；Chemicon International，Temecula，CA；cat. no. MAB3228）。

(8) 角蛋白 15 单克隆抗体（CBL 272；Chemicon International，Temecula，CA；cat. no. CBL272）。

2.3 溶液

X-gal 染色液：含有 1 mg/ml X-gal、5 mmol/L 铁氰化钾、5 mmol/L 亚铁氰化钾和 2 mmol/L $MgCl_2$ 的磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）。

3 方法

3.1 毛囊基因治疗的方法

3.1.1 *lacZ* DNA 的纯化[2]

（1）含 *lacZ* 基因的重组逆转录病毒（pM-MuLV-SV-*lacZ*）获自 Joshua R. Sanes（Washington University，St. Louis，MO）。

（2）用标准的方法将 *lacZ* 质粒转入 HB101 大肠杆菌感受态细胞（Promega Corporation）。

（3）使用 Promega Wizard™ Megaprep DNA 纯化系统纯化质粒 *lacZ* DNA。

3.1.2 *lacZ* 脂质体的制备[2]

（1）将磷酸卵磷脂：胆固醇：磷脂酰乙醇胺以 5：3：2 的比例配成总量为 20 mg 的脂质，用真空干燥器从其氯仿溶液中旋转蒸发 1 h，从而在 5 ml 的圆底烧瓶壁上形成一层薄膜。

（2）用含约 1 mg *lacZ* DNA 的 0.6 ml Tris-乙烯二胺四乙酸（TE）缓冲液在涡旋搅拌器上悬浮干燥的薄膜脂质。

（3）在紧密型水浴超声破碎器中声裂 20 min，然后反复冷冻（－70℃）与融化（室温）三次，使 *lacZ* 包裹入脂质体中。

3.1.3 *lacZ* 脂质体的局部应用[2]

（1）使用已脱毛的 5～6 周龄 BALB/c 小鼠。

（2）使用 *lacZ* 脂质体的皮肤区域预先用 PBS 浸湿 10～30 min。

（3）将制成的 *lacZ* 脂质体（50 μl）直接涂于皮肤上，1 h 后再重复给予。未处理的小鼠和用裸 *lacZ* DNA 处理的小鼠作为对照。

（4）在使用 *lacZ* 脂质体 3 d 后进行 X-gal 染色，采集皮肤前先用 70%的异丙醇仔细清洗。

3.1.4 X-gal 染色检测 *LacZ* DNA 的表达[2]

（1）采集的皮肤样品应立即放入含联合抗生素的 MEM 溶液中清洗，4℃ 1 h。

（2）皮肤用含 2%（*V/V*）多聚甲醛和 0.2%（*V/V*）戊二醛的 PBS 液 4℃固定 30 min。

（3）然后用 PBS 液冲洗组织三次，再置于 X-gal 染色溶液中 37℃孵育 18 h。

（4）皮肤组织用标准的组织学方法进行石蜡切片，0.1%核坚固红复染后，在普通

光学显微镜下照相。

3.1.5 腺病毒 GFP 载体[26]

含 GFP 的腺病毒载体，pQBI-AdCMV5GFP 购买自 Qbiogene 公司（Montreal，Quebec，Canada）。

3.1.6 小鼠[26]

（1）用 C57BL/10 和 C57BL/6-Tyr<c-2J>/+ 小鼠（8 周龄）作为皮肤供者。

（2）用 CD-1 裸小鼠（7 周龄）作为皮肤移植的受者。

3.1.7 生长期的诱导[26]

（1）用 50 mg/kg 体重的氯胺酮（Burns Veterinary Supply，Vancouver，WA）麻醉休止期小鼠（通过粉红色的皮肤来判断）。

（2）小鼠供皮区（3 cm×5 cm）用脱毛蜡脱毛，以诱导同步的生长期。

3.1.8 皮肤组织培养及胶原酶处理[26]

（1）在脱毛后第 6 天，用颈脱位法处死小鼠。

（2）切开背部皮肤至皮下组织水平。

（3）去除皮下组织，用不含钙、镁的磷酸盐缓冲盐溶液（CMF-PBS，pH 7.4）漂洗皮肤。

（4）将皮肤样品切成（1 mm×1 mm）～（2 cm×2 cm）的小块。

（5）一部分样品作为未处理对照，直接培养在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中。

（6）其余样品培养在 2 mg/ml I 型胶原酶（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO）溶液 37℃孵育 45 min～3 h 45 min，再用 CMF-PBS 漂洗。

3.1.9 组织培养皮肤中毛囊的 GFP 转导[26]

（1）胶原酶处理的皮肤组织培养物，用每毫升培养液含 2.4×10^6～5.0×10^9 个噬菌斑形成单位（pfu）的 pQBI-AdCMV5GFP 感染。

（2）皮肤组织培养物在新鲜的 RPMI 1640（10% FBS）中 37℃孵育 1～6 h。

3.1.10 GFP 转染皮肤组织培养物的移植[26]

（1）为了观察转基因在体内的表达，可将病毒 GFP 转染后的组织培养皮肤移植至裸鼠或 C57BL/10 小鼠上。组织培养样品应在采集后 24h 内移植。移植手术应使用无菌操作，在层流通风橱内进行。

（2）用氯胺酮麻醉小鼠。

（3）事先去除受者小鼠皮肤至筋膜层，并造成 1 cm×1 cm 大小的创面床，然后移植 1 cm×1 cm 大小的皮肤块。用 6 号的不吸收单丝缝线将移植皮肤固定在适当位置。

3.1.11　GFP 转染毛囊和毛干的荧光显微镜观察[26]

（1）使用配有 50W 汞灯的尼康荧光显微镜（Tokyo，Japan）和 LZ12 型莱卡荧光立体显微镜（Leica Inc.，Deerfield，IL）。

（2）通过在 Hamamatsu C5810 型三芯片冷色 CCD 照相机（Hamamatsu Photonics Systems，Bridgewater，NJ）上的 GG475 型长通滤光片（Chroma Technology，Brattleboro，VT）收集发射荧光。

3.1.12　GFP 转染毛囊的定量[26]

（1）毛囊和 GFP 阳性毛囊的数量分别用亮视野显微镜和荧光显微镜测定。计数方法是基于 5 个随机选择视野中毛囊的平均个数，每个视野的面积为 0.581 mm^2（200 倍放大）。

（2）每组至少计数 500 个毛囊用于计算 GFP 阳性毛囊的百分数。

（3）不管观察到的 GFP 是在球部还是毛干，此毛囊都将视为 GFP 阳性而被计数。

3.1.13　从 GFP 转导组织培养物和移植皮肤中分离毛囊和真皮乳头[26]

（1）在病毒转导 GFP 后的几个时相点，分别从组织培养皮肤和移植皮肤中分离毛囊，以测定 GFP 的表达部位。

（2）将组织培养皮肤或皮肤移植块，培养在 2 mg/ml I 型胶原酶溶液中，37℃孵育 2 h，然后在培养基中漂洗以释放出毛囊。

3.1.14　用于组织学和细胞学研究的皮肤样品的制备[26]

（1）在转导病毒 GFP 后的几个时相点，分别采集皮肤块用于组织学研究，以测定 GFP 的表达部位。

（2）组织培养皮肤或皮肤移植块应保存在－80℃。

（3）使用莱卡 CM1850 型恒冷切片机（Hacker Instruments，Inc.，Fairfield，NJ）对冰冻样品切片，并收集在载玻片（Fisher Scientific，Pittsburgh，PA）上。

3.1.15　从组织培养皮肤分离 RNA 和进行 RT-PCR[26]

（1）用 1 ml Tri 试剂（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO）对皮肤样品（100 mg）进行匀浆以提取 RNA。

（2）RT-PCR 需先将约 10 μg 的 RNA 逆转录为第一 cDNA 链。

（3）逆转录在每管含 500 μmol/L dNTP 和 20 U AMV 逆转录酶（Strategene，San Diego，CA）的 20 μl 第一链缓冲液中进行。第一链的引物为 pGFP 反义链。

（4）42℃孵育 50 min。

（5）将逆转录的产物用 PCR 进行扩增。用小鼠 β-肌动蛋白（β-actin）mRNA 作为标准（或内参）。GFP 上游引物序列为 5′-ATG GCT AGC AAA GGA GAA GAA CT-3′；下游引物为 5′-TCA GTT GTA CAG TTC ATC ACT G-3′。

（6）GFP 和 β-actin 两者的 PCR 反应条件如下：97℃首次变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，最后 72℃延伸 10 min。

3.2 表达 GFP 毛囊的显像[28]

3.2.1 巢蛋白-GFP 转基因小鼠[28]

巢蛋白是一种中间丝蛋白，是中枢神经系统祖细胞和神经上皮干细胞的标志。实验使用 EGFP 转基因小鼠，其携带的 EGFP 转基因受巢蛋白第二内含子的增强子控制。毛囊干细胞也明显地表达巢蛋白，这可从巢蛋白调节的 EGFP 表达得到证实。

3.2.2 生长期的诱导[28]

（1）巢蛋白调节的 GFP 转基因小鼠，6～8 周龄，处于毛囊生长的静息期，采用松香和蜂蜡的加热混合物进行脱毛。

（2）在脱毛前（静息期）以及脱毛后第 1、2、3、4、5 天（生长期的早期），第 8、10 天（生长期的中期），第 14、15 天（生长期的晚期），第 19、20 天（退化期）从背部皮肤上切取样本（5 mm×5 mm ）。

（3）将皮肤样品分成两部分，一部分用于荧光显微镜检测，另一部分用于冰冻切片。

（4）将皮肤样品埋入组织冰冻包埋剂中，－80℃冷冻过夜。

（5）用莱卡 CM1850 型恒冷切片机切成 8 μm 厚薄片。

（6）冰冻切片风干后，用碘化丙啶复染后，再进行荧光显微镜检测。

3.2.3 荧光共聚焦显微镜[28]

切去皮下组织后，在配有 GFP 光学系统的尼康荧光显微镜下，直接观察表达巢蛋白-GFP 皮肤样品的真皮以上和表皮以下部分。也可以使用装有 10 倍平面物镜尼康显微镜（Nikon Optiphot）的 MRC-600 共聚集成像系统（Bio-Rad）。

3.2.4 免疫组化染色[28]

（1）在 C57BL/6 小鼠和巢蛋白-GFP 转基因小鼠皮肤的石蜡包埋切片中，可用 DAKO ARK 动物研究试剂盒（巢蛋白和角蛋白）和 DAKO EnVision 双重染色系统检测巢蛋白、角蛋白（5、8 和 15）及 GFP 的共定位（colocalization），操作方法可参考制造商的说明书。

（2）皮肤样品中内源性过氧化物酶的活性，可通过与过氧化物酶阻断溶液共孵育 5min 而灭活。

（3）将载玻片与准备好的生物素化第一抗体孵育（GFP MAb 1∶100，nestin MAb 1∶80，keratin 5/8 MAb 1∶250 和 keratin 15 MAb 1∶100）15min，再与链亲和素（streptavidin）-过氧化物酶孵育 15 min。

（4）最后与底物-色原体 3，3′-二氨基联苯胺（DAB）或核坚固红共孵育 5 min 即可完成染色。棕色（DAB）或樱桃红（核坚固红）用于抗原染色。巢蛋白单克隆抗体（Rat 401）购于爱荷华大学（Iowa City，IA）的 DSHB，角蛋白 5/8 单克隆抗体（MAB3228）和角蛋白 15 单克隆抗体（CBL 272）购于 Chemicon International 公司（Temecula，CA）。

4 注意事项

(1) 毛囊的位置和结构提供了独特的治疗机会。如前所述，我们和其他一些研究者已经展示了毛囊可作为功能性基因的选择性靶点。已采用的两种实验策略为：①局部应用脂质体包裹的 DNA；②离体的定向腺病毒基因载体。这些高度特异性的毛囊定向方法为纠正毛囊缺陷（如秃顶或色素丢失）的基因筛选提供了可能性；也可获益于毛囊的合成能力，以产生对全身性疾病有治疗作用的蛋白质[2,26]。

(2) 我们使用巢蛋白-GFP 转基因小鼠，可以实时地观察毛囊干细胞。这种能力使得选择性定向毛囊干细胞的基因治疗成为可能，也使治疗性地使用干细胞本身来生成新的毛囊成为可能[28]。

（王　勇译　彭代智校）

参考文献

[1] Hoffman, R. M. (2000) The hair follicle as a gene therapy target. *Nat. Biotechnol.* **18**, 20—21.

[2] Li, L. and Hoffman, R. M. (1995) The feasibility of targeted selective gene therapy of the hair follicle. *Nat. Med.* **1**, 705—706.

[3] Li, L., Margolis, L. B., and Hoffman, R. M. (1991) Skin toxicity determined in vitro by threedimensional, native-state histoculture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1908—1912.

[4] Li, L., Margolis, L. B., Paus, R., and Hoffman, R. M. (1992) Hair shaft elongation, follicle growth, and spontaneous regression in long-term gelatin sponge-supported histoculture of human scalp skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8764—8768.

[5] Li, L., Margolis, L. B., Lishko, V. K., and Hoffman, R. M. (1992) Product-delivering liposomes specifically target hair follicles in histocultured intact skin. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28A**, 679—681.

[6] Li, L., Lishko, V. K., and Hoffman, R. M. (1993) Liposomes can specifically target entrapped melanin to hair follicles in histocultured skin. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29A**, 192—194.

[7] Li, L., Lishko, V. K., and Hoffman, R. M. (1993) Liposome targeting of high molecular weight DNA to the hair follicles of histocultured skin: a model for gene therapy of the hair growth processes. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29A**, 258—260.

[8] Li, L., Lishko, V., and Hoffman, R. M. (1994) High efficiency liposome-mediated transfection of the tyrosinase gene to cultured cells: a model for the gene therapy of hair color restoration. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **30A**, 135—138.

[9] Yarosh, D., Buana, C., Cox, P., Alas, L., Kibitel, J., Kripke, M. (1994) Localization of liposomes containing a DNA repair enzyme in murine skin. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 461—468.

[10] Hoffman, R. M., Margolis, L. B., and Bergelson, L. D. (1978) Binding and entrapment of high molecular weight DNA by lecithin liposomes. *FEBS Lett.* **93**, 365—368.

[11] Cotsarelis, G., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implication for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329—1337.

[12] Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G., and Birchmeier, W. (2001) β-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* **105**, 533—545.

[13] Shibahara, S., Tomita, Y., Tagami, H., Muller, R. M., and Cohen, T. (1988) Molecular basis for the heterogeneity of human tyrosinase. *J. Exp. Med.* **156**, 403—414.

[14] Tanaka, S., Yamamoto, H., Takeuchi, S., and Takeuchi, T. (1990) Melanization in albino mice transformed by introducing cloned mouse tyrosinase gene. *Development* **108**, 223—227.

[15] Cotsarelis, G. (1997) The hair follicle: dying for attention. *Am. J. Pathol.* **151**, 1505—1509.

[16] Paus, R. and Cotsarelis, G. (1999) The biology of hair follicles. Review. *N. Engl. J. Med.* **341**, 491—497.

[17] Domashenko, A., Gupta, S., and Cotsarelis, G. (2000) Efficient delivery of transgenes to human hair follicle progenitor cells using topical lipoplex. *Nat. Biotechnol.* **18**, 420—423.

[18] Chase, H. (1954) Growth of the hair. *Physiol. Rev.* **34**, 113—126.

[19] Gilhar, A., Ullmann, Y., Berkutzki, T., Assy, B., and Kalish, R.S. (1998) Autoimmune hair loss (alopecia areata) transferred by T lymphocytes to human scalp explants on SCID mice. *J. Clin. Invest.* **101**, 62—67.

[20] Wrone-Smith, T. and Nickoloff, B.J. (1996) Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J. Clin. Invest.* **98**, 1878—1887.

[21] Alexeev, V., Igoucheva, O., Domashenko, A., Cotsarelis, G., and Yoon, K. (2000) Localized in vivo genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide. *Nat. Biotechnol.* **18**, 43—47.

[22] Sato, N., Leopold, P. L., and Crystal, R. G. (1999) Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *J. Clin. Invest.* **104**, 855—864.

[23] Ahmad, W., Faiyaz ul Haque, M., Brancolini, V., Tsou, H.C., ul Haque, S., Lam, H., et al (1998) Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science* **279**, 720—724.

[24] Choate, K. A., Medalie, D. A., Morgan, J. R., and Khavari, P. A. (1996) Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat. Med.* **2**, 1263—1267.

[25] Reynolds, A.J., Lawrence, C., Cserhalmi-Friedman, P.B., Christiano, A.M., and Jahoda, C.A. (1999) Trans-gender induction of hair follicles. *Nature* **402**, 33—34.

[26] Saito, N., Zhao, M., Li, L., Baranov, E., Yang, M., Ohta, Y., et al. (2002) High efficiency genetic modification of hair follicles and growing hair shafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13 120—13 124.

[27] Fan, H., Lin, Q., Morrissey, G.R., and Khavari, P.A. (1999) Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat. Biotechnol.* **17**, 870—872.

[28] Li, L., Mignone, J., Yang, M., Matic, M., Penman, S., Enikolopov, G., et al. (2003) Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9958—9961.

索　引

D

E

F

G

H

J

K

L

M

N

P

Q

其他

彩　　图

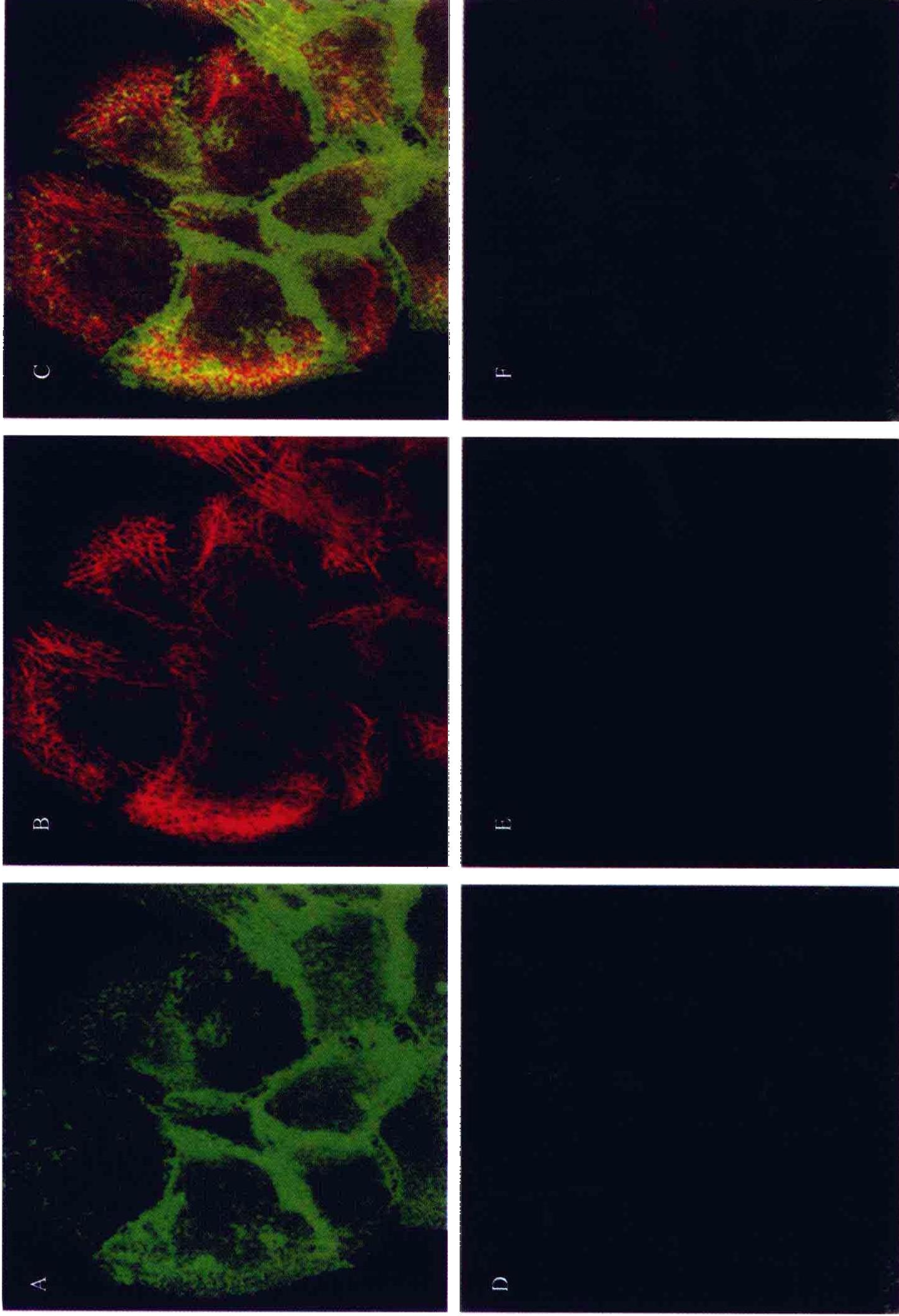


图20.3　HaCaT细胞的双重染色免疫荧光显微照片

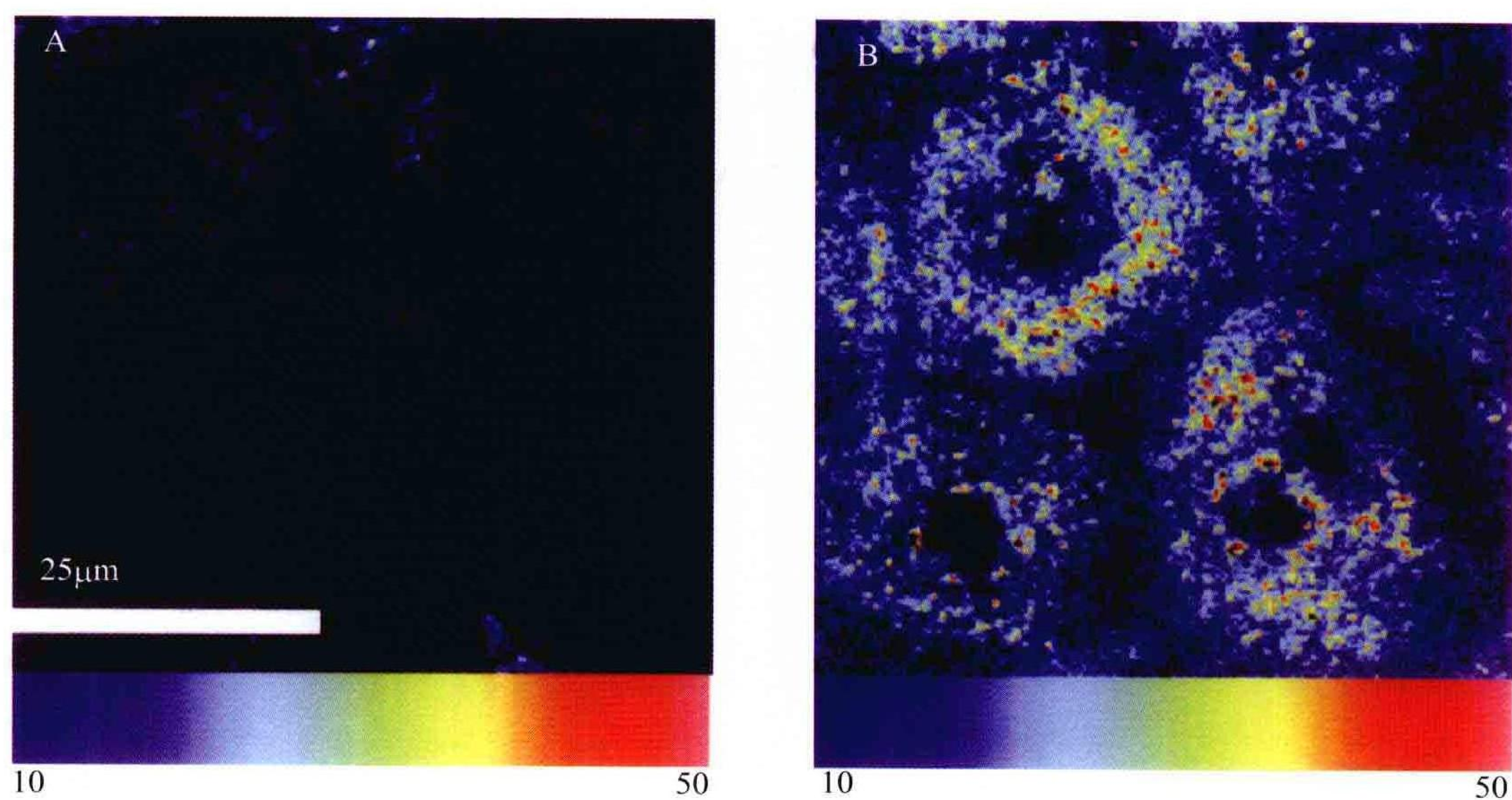


图39.2　与DHR孵育的人胸部离体皮肤在UV辐照(600 J/m^2)前(A)、后(B)的双光子荧光强度成像

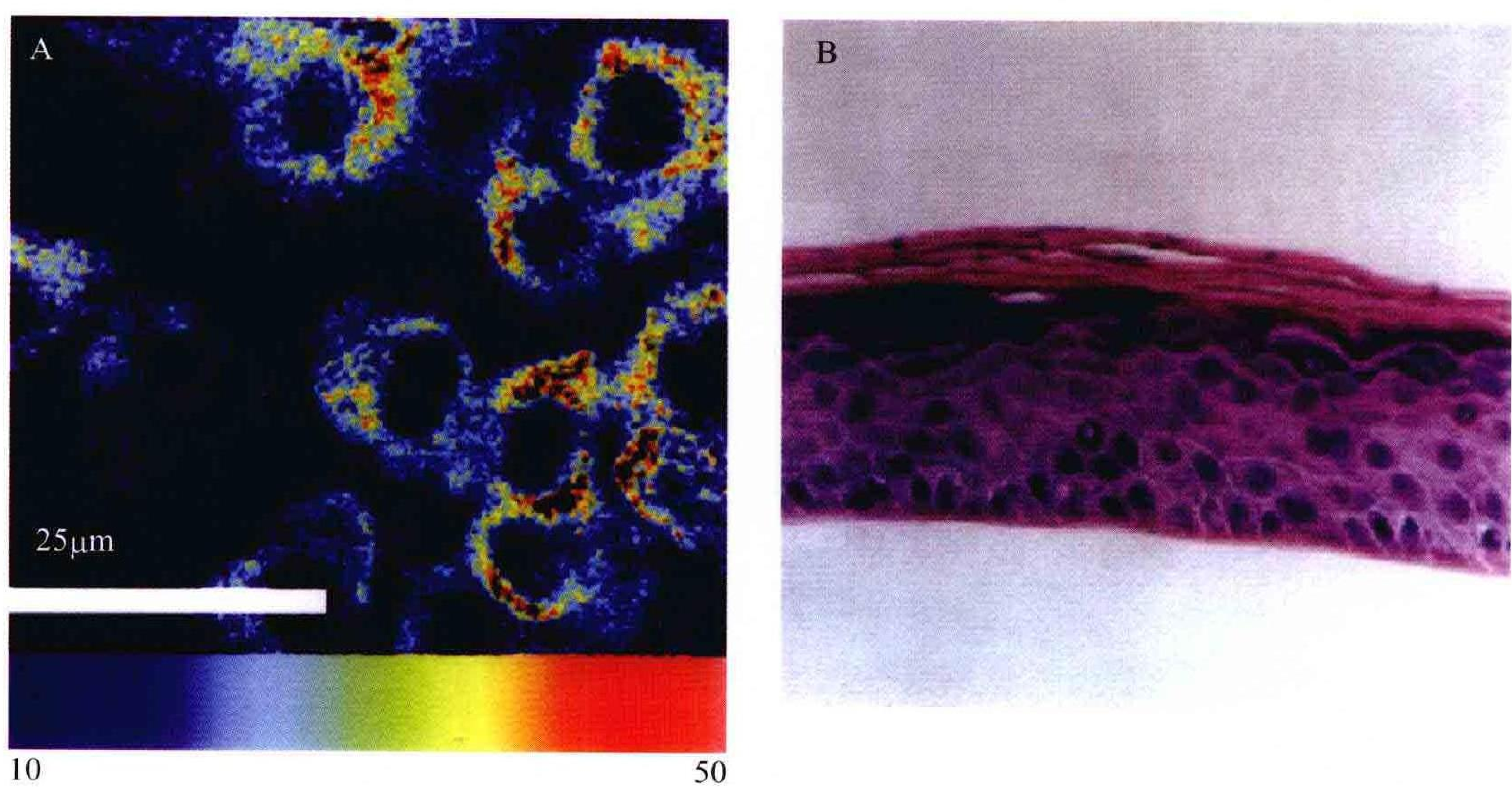
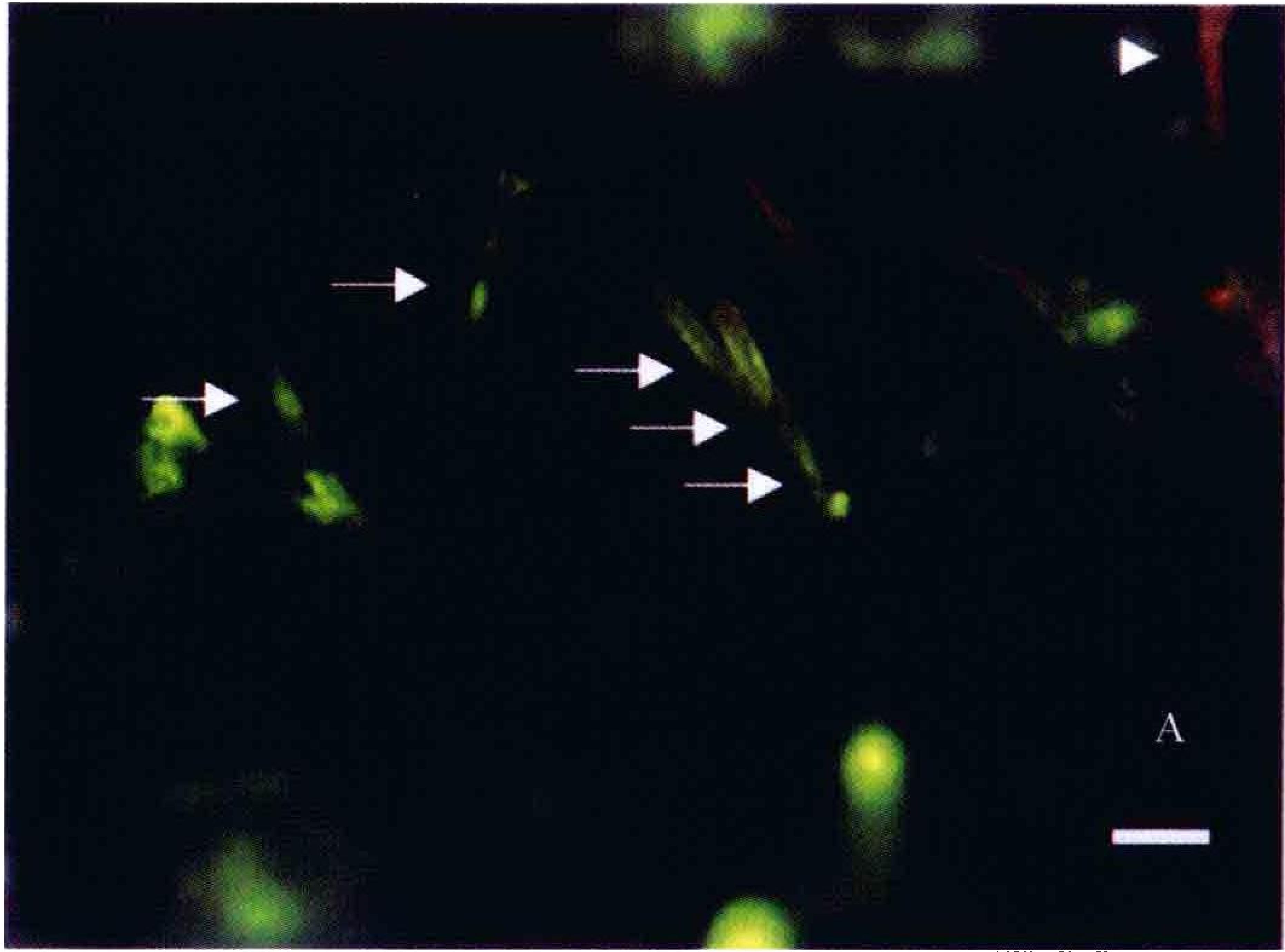
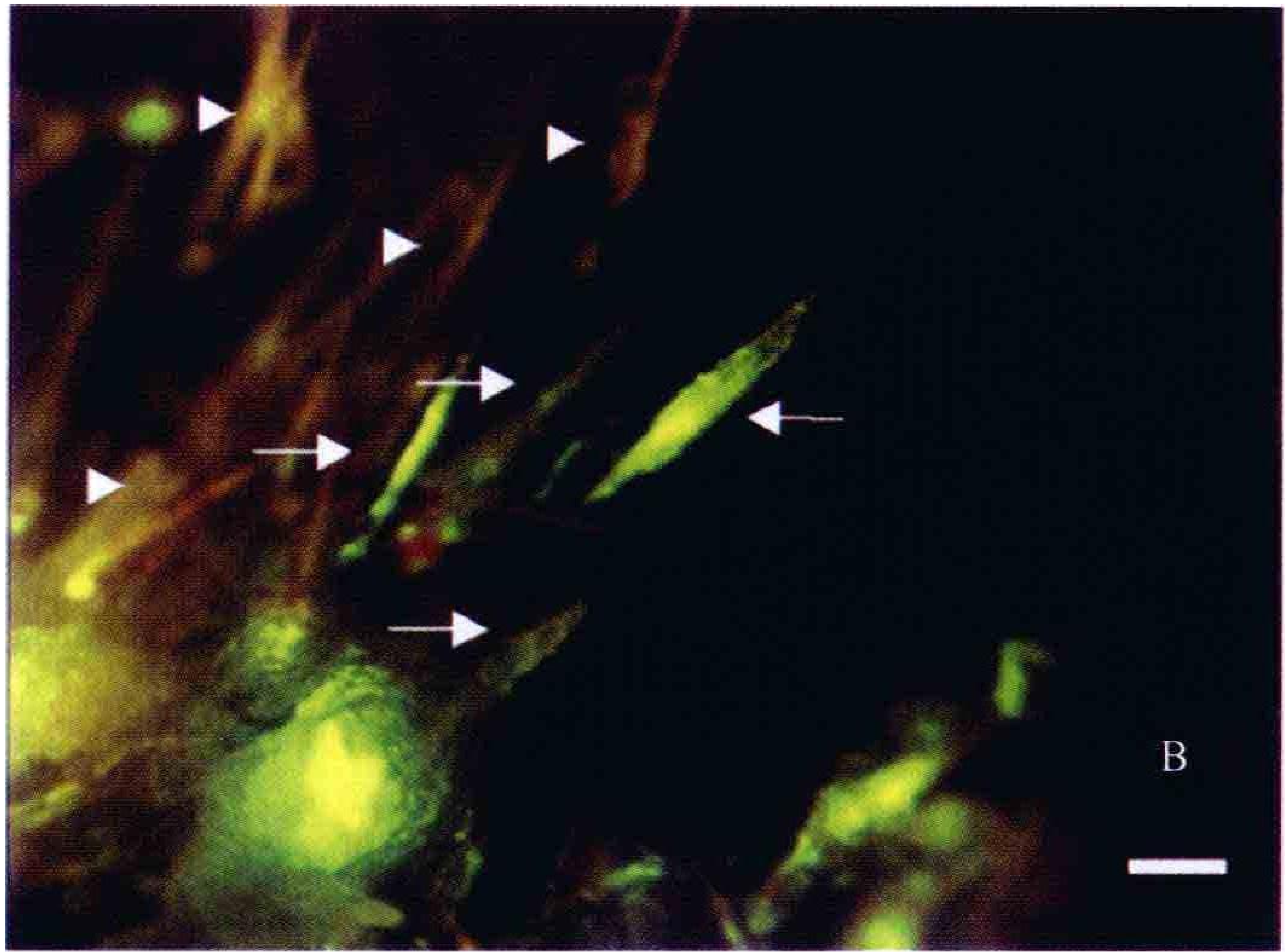


图39.3　皮肤替代物EpiDerm™200显示出与离体皮肤相似的活性氧荧光影像





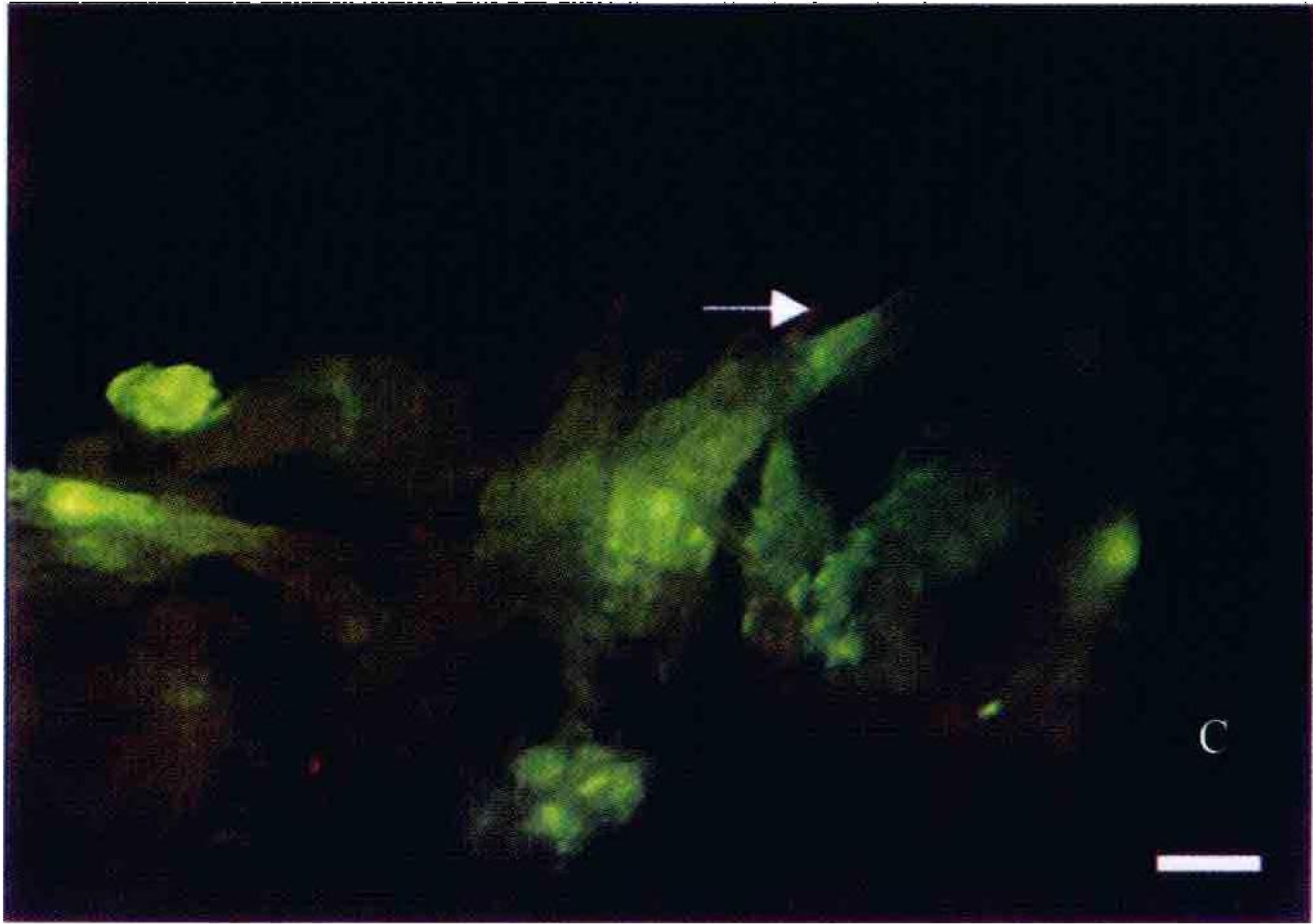


图42.1　在腺病毒-GFP转染的移植皮肤毛干中的GFP显影

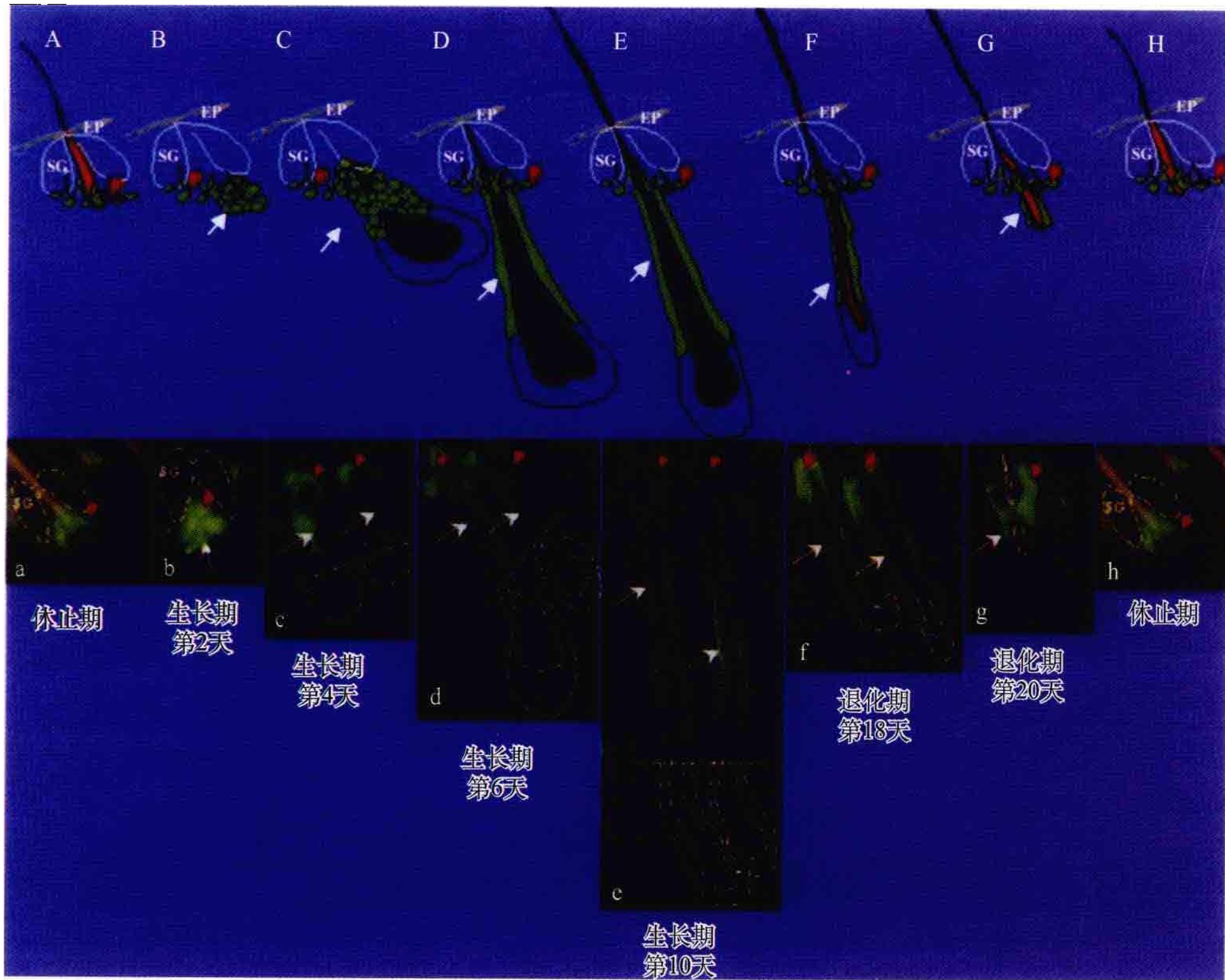


图42.2 毛发生长周期中的毛囊干细胞